

DAS WACHSTUMSVERHALTEN DER GERMINATIVEN ZONE DES GROSSHIRNS
NACH PRÄNATALER APPLIKATION VON ETHYLNITROSO-
HARNSTOFF UND POSTNATALER OPIOIDREZEPTORBLOCKADE
BEI DER RATTE

Ruth Funk

Disbui. München

1989



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554827_0067

Aus dem Institut für Pathologie der Gesellschaft für
Strahlen- und Umweltforschung mbH München
(Direktor: Prof.Dr. W. Gössner)
Arbeitsgruppe "Embryologie und Teratologie"
(Leiter: Dr.med.vet.habil. W. Schmahl)

Vorgelegt über den
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof.Dr. E. Dahme

**DAS WACHSTUMSVERHALTEN DER GERMINATIVEN ZONE DES GROSSHIRNS
NACH PRÄNATALER APPLIKATION VON ETHYLNITROSO-
HARNSTOFF UND POSTNATALER OPIOIDREZEPTORBLOCKADE
BEI DER RATTE**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Ruth Funk
aus
Kleve

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Univ.-Prof. Dr. E. Dahme

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. H.-G. Liebich

Tag der Promotion: 24. Februar 1989

1. Einleitung

1.1. Zielsetzung

1.2. Begriffe

1.2.1. Zielsetzung und Zielvorgabe

1.2.2. Zielvorgabe und Zielsetzung

1.2.3. Zielvorgabe und Zielsetzung

1.2.4. Zielvorgabe und Zielsetzung

1.2.5. Zielvorgabe und Zielsetzung

1.2.6. Zielvorgabe und Zielsetzung

1.2.7. Zielvorgabe und Zielsetzung

Meinen Eltern

1.2.8. Zielvorgabe und Zielsetzung

1.2.9. Zielvorgabe und Zielsetzung

1.2.10. Zielvorgabe und Zielsetzung

1.2.11. Zielvorgabe und Zielsetzung

1.2.12. Zielvorgabe und Zielsetzung

1.2.13. Zielvorgabe und Zielsetzung

1.2.14. Zielvorgabe und Zielsetzung

1.2.15. Zielvorgabe und Zielsetzung

1.2.16. Zielvorgabe und Zielsetzung

1.2.17. Zielvorgabe und Zielsetzung

1.2.18. Zielvorgabe und Zielsetzung

1.2.19. Zielvorgabe und Zielsetzung

1.2.20. Zielvorgabe und Zielsetzung

1.2.21. Zielvorgabe und Zielsetzung

1.2.22. Zielvorgabe und Zielsetzung

1.2.23. Zielvorgabe und Zielsetzung

1.2.24. Zielvorgabe und Zielsetzung

1.2.25. Zielvorgabe und Zielsetzung

1.2.26. Zielvorgabe und Zielsetzung

1.2.27. Zielvorgabe und Zielsetzung

1.2.28. Zielvorgabe und Zielsetzung

1.2.29. Zielvorgabe und Zielsetzung

1.2.30. Zielvorgabe und Zielsetzung

INHALTSVERZEICHNIS

1. PROBLEMSTELLUNG	1
2. EINLEITUNG	2
2.1. Teratogene und kanzerogene Wirkungen von Ethylnitrosoharnstoff (ENU) am ZNS der Ratte	2
2.1.1. ENU: Stoffgruppenzugehörigkeit, chemische Eigenschaften und molekularbiologischer Wirkungsmechanismus	2
2.1.2. Teratogene Wirkungen von ENU	4
2.1.3. Kanzerogene Wirkungen von ENU	8
2.2. Sequenz der Gehirnveränderungen nach postnataler Applikation von ENU	13
2.2.1. Soforteffekte	13
2.2.2. Postnatale Gehirnveränderungen	15
2.2.3. Chronologie der RepARATION von frühen Läsionen	20
2.3. Tumormodifizierende Faktoren	21
2.3.1. Effekte chemischer Verbindungen auf die Tumorentwicklung	21
2.3.2. Wirkung von Opioidantagonisten auf das Wachstum bestehender Tumoren	24
2.4. Die postnatal ablaufende Entwicklung der Opioidrezeptoren im Gehirn der Ratte	30
2.5. Neuropharmakologische Beeinflußbarkeit der Opioidrezeptorentwicklung im Gehirn von Nagetieren (Ratte und Maus) durch Opiate, Opioide und deren Antagonisten	36

3. MATERIAL UND METHODEN	44
3.1. Versuchstiere	44
3.2. Behandlung mit ENU	45
3.3. Behandlung mit Naltrexone	45
3.4. Sektionen	46
3.4.1. Applikation von 3-H-Thymidin	46
3.5. Herstellung der histologischen Präparate und Befunderhebung	46
3.6. Entwicklung, Fixierung und Auswertung der Autoradiographien	47
3.7. Darstellung der Ergebnisse	48
 4. ERGEBNISSE	 49
4.1. Kontrollen	49
4.1.1. Körpergewichts- und Organgewichtsentwicklung	49
4.1.2. Histologische Befunde	49
4.1.3. Mitoserate	50
4.1.4. Markierungshäufigkeit	50
4.2. Naltrexone-behandelte Tiere	51
4.2.1. Körpergewichts- und Organgewichtsentwicklung	51
4.2.2. Histologische Befunde	51
4.2.3. Mitoserate	52
4.2.4. Markierungshäufigkeit	52
4.3. ENU-behandelte Tiere	52
4.3.1. Körpergewichts- und Organgewichtsentwicklung	52
4.3.2. Histologische Befunde	53
4.3.3. Mitoserate	55
4.3.4. Markierungshäufigkeit	55
4.4. ENU + Naltrexone-behandelte Tiere	56
4.4.1. Körpergewichts- und Organgewichtsentwicklung	56
4.4.2. Histologische Befunde	57

4.4.3. Mitoserate	59
4.4.4. Markierungshäufigkeit	60
4.5. Anhang: Abbildungen, graphische Darstellungen und Tabellen	61
4.5.1. Abbildungen	61
4.5.2. Graphische Darstellungen	69
4.5.3. Tabellen	73
 5. DISKUSSION	 82
5.1. Die durch Naltrexone (NX) bewirkte Wachstums- steigerung des Gehirns	82
5.2. Zelluläre Wirkungsmechanismen des NX auf die germinative Zone des Großhirns	82
5.2.1. Die adrenerge Innervierung des Gehirns in der Perinatalperiode	84
5.2.2. Zusammenhang zwischen adrenergem System und Wachstumsvorgängen	86
5.2.3. Mögliche Interaktionen zwischen Opioid- system und β -adrenergem System	87
5.3. Histogenese der Veränderungen der telen- cephalen SEZ durch NX-Applikation	89
5.4. Der tumorpromovierende Effekt des NX bei der Entstehung von Gliomen	95
 6. ZUSAMMENFASSUNG	 99
 7. SUMMARY	 101
 8. LITERATURVERZEICHNIS	 103

1. PROBLEMSTELLUNG

In den vergangenen Jahren häuften sich die Befunde über den bereits in der Fetalentwicklung des ZNS vorhandenen dichten Besatz neuronaler und glialer Zellen mit Opioidrezeptoren. Gleichzeitig wurden richtungsweisende Erkenntnisse über die Aufgaben solcher Rezeptoren gewonnen, unter denen offensichtlich die Regulation des Wachstums der rezeptortragenden Zellen an erster Stelle steht.

Die Arbeiten mit wachstumsmodifizierenden Faktoren beschäftigten sich in der Vergangenheit zunehmend mit angewandten Themen wie der Tumorentwicklung und -ausbreitung. Die Wirkung der Opioide als wachstumsmodulierende Komponente wurde bisher jedoch lediglich bei experimentell in die Nacktmaus transplantierten neuronalen Tumoren untersucht. Über den Einfluß der Opioide auf in situ entstehende Tumoren war bis dato noch nichts bekannt.

Die vorliegende Arbeit ist auf diesen bisher unbeachtet gebliebenen Aspekt der Opioidwirkung auf die in-situ-Entstehung von Neoplasien gerichtet. Es sollte der Frage nachgegangen werden, in welcher Weise diaplazentar induzierte Gliome des Rattengehirns durch einen selektiven Opioidantagonisten beeinflusst werden können. Dabei war beabsichtigt, Versuchstechniken, die die Tumoren möglicherweise manipulieren könnten, zu umgehen.

Der Umweg über den Opioidantagonisten Naltrexone erschien aus Gründen der praktischen Durchführbarkeit der Experimente angeraten und erwies sich als nicht störend für eine Interpretation der Versuchsergebnisse.

Als karzinogenes Agens wurde Ethylnitrosoharnstoff verwendet, eine Verbindung, deren diaplazentar tumorinduzierenden Effekte vor allem am Gehirn gut untersucht sind.

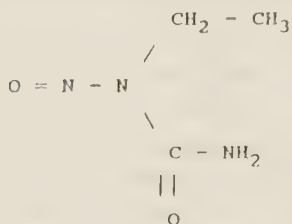


2. EINLEITUNG

2.1. Teratogene und kanzerogene Wirkungen von Ethylnitrosoharnstoff (ENU) am ZNS der Ratte

2.1.1. ENU : Stoffgruppenzugehörigkeit, chemische Eigenschaften und molekularbiologischer Wirkungsmechanismus

N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff (ENU), mit der Substanzformel



gehört zu der Stoffgruppe der N-Nitrosamide. Diese können sowohl als N-Nitroso-Derivate monosubstituierter Acylamide, als auch als N-Nitroso-N-Alkylderivate des Harnstoffes aufgefaßt werden. Die Bezeichnung N-Nitroso-Verbindungen ist der Überbegriff für die N-Nitrosamide und die N-Nitrosamine.

DRUCKREY et al. (1966) entdeckten als erste die karzinogene Wirksamkeit der N-Nitroso-Verbindung ENU. Sie machten über die chemischen Eigenschaften folgende Angaben: ENU zerfällt bei 20°C rasch und spontan mit einer Halbwertszeit von 31h bei pH 6 und 0,1h bei pH 8.

Die biologische Toxizität von ENU, ausgedrückt als akute LD₅₀, beträgt für adulte BD-IX-Ratten bei intravenöser und intraperitonealer Applikation 250mg/kg Körpergewicht (KGW) (DRUCKREY et al., 1967) und für adulte Sprague-Dawley-Ratten 375mg/kg KGW (WECHSLER, 1972).

KIRSCH et al. (1972) teilten die chemischen Karzinogene gemäß ihrer Reaktivität mit zellulären Makromolekülen in drei Gruppen ein: 'precarcinogens', 'proximate carcino-

gens' und 'ultimate carcinogens'. ENU und alle seine Metaboliten wurden von BOSCH (1977) und WECHSLER (1972) in die Gruppen der 'proximate' und 'ultimate carcinogens' eingeteilt, was bedeutet, daß sie keiner enzymatischen Aktivierung bedürfen und eine gewebespezifische Karzinogenität besitzen ('proximate carcinogens'), bzw. daß sie direkt karzinogen wirken ('ultimate carcinogens') (BOSCH, 1977).

Demgegenüber stellt PREUSSMANN (1984) fest, daß N-Nitroso-Verbindungen in jedem Fall einer Transformation bedürfen, um die charakteristischen biologischen Effekte auslösen zu können. Er zeigt aber einen Unterschied zwischen den Metabolisierungsprozessen von N-Nitrosamiden und N-Nitrosaminen auf. So zerfallen die chemisch reaktiven N-Nitrosamide (z.B. ENU) in Form einer Hydrolyse und möglicherweise katalysiert durch SH-Verbindungen in elektrophile, ethylierende Agenzien. Die chemisch stabilen N-Nitrosamine verlangen für ihren Umwandlungsprozeß, bei dem es sich ebenfalls, wie bei den N-Nitrosamiden, um einen Hydrolysevorgang handelt, der zur Bildung alkylierender Substanzen führt, eine metabolische Aktivierung in mehreren Schritten durch bestimmte Enzyme. Die Hydrolyseprodukte der N-Nitrosoverbindungen reagieren mit nukleophilen Reaktionspartnern (DNA, RNA und anderen Biopolymeren) und bilden stabile Addukte, wie alkylierte Purin- und Pyrimidinbasen und Kernproteine (MAGEE et al., 1975; PREUSSMANN, 1984).

Diese Alkylierung von genetischem Material wird als gentoxischer Effekt aufgefaßt und ist möglicherweise das auslösende Ereignis der Karzinogenese (PREUSSMANN, 1984).

Schon 1969 wies LOVELESS auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der Ethylierung in Position 0-6 des Guanins (0-6-Ethyl-Guanin) und der mutagenen und kanzerogenen Wirkung von ENU hin.

Den Nachweis, daß 0-6-Ethyl-Guanin die Basenpaarung der beiden komplementären DNA-Stränge stört, erbrachten GERCHMAN und LUDLUM (1973). In einem in-vitro-Versuch

stellten sie fest, daß sich 0-6-Methyl-Guanin in einem synthetischen Gemisch aus Polyribo- oder Polydesoxyribonukleotiden wie Adenin verhält.

Bei der Ratte konnten GOTH und RAJEWSKY (1974) nach Applikation von C^{14} -markiertem ENU in vivo die Bildung von N-7-Ethyl-Guanin, 0-6-Ethyl-Adenin und N-7-Ethyl-Adenin nachweisen und jeweils quantitativ bestimmen.

SINGER (1976) und SINGER et al. (1978) zeigten in in-vitro-Versuchen, daß das ethylierende Hydrolyseprodukt von ENU bevorzugt mit dem Sauerstoff sowohl der Nukleinsäurebasen, als auch des Phosphodiesters reagiert.

Der durch die Alkylierung an der DNA gesetzte Schaden manifestiert sich bei der nächsten DNA-Replikation in den Tochterzellen, oder die Zelle stirbt gleich nach Einwirken der Noxe.

ENU interferiert also besonders mit der Teilungsaktivität wachsender Gewebe. Somit besitzt ENU zytotoxische, mutagene, teratogene und karzinogene Eigenschaften.

Während die Prinzipien der Metabolisierung von N-Nitroso-Verbindungen gut untersucht sind, ist weniger bekannt über die biochemisch-molekularbiologischen Mechanismen der Organspezifität bei der Karzinogenese durch N-Nitroso-Verbindungen. Die Gründe dafür könnten zu suchen sein in der Schwierigkeit der Bestimmung der Pharmakokinetik der Verteilung von N-Nitroso-Verbindungen im Organismus, den verschiedenen metabolischen Fähigkeiten der Organe, der Spezifität der jeweiligen DNA-Schaden und dem Ausmaß und der Präzision der DNA-Reparation (PREUSSMANN, 1984).

2.1.2. Teratogene Wirkungen von ENU

Die ersten Publikationen über durch intravenöse Applikation von ENU an trächtigen Ratten ausgelöste teratogene Effekte stammen von DRUCKREY et al. (1966), IVANKOVIC und DRUCKREY (1968) und VON KREYBIG (1968).

ENU passiert die plazentare Schranke und vermag dann, den sich entwickelnden Embryo oder Fetus zu schädigen.

Experimentell durch ENU auslösbare Mißbildungen sind

Ektro-, Oligo- und Syndaktilie, also Mißbildungen an den Pfoten von Vorder- und Hinterbeinen (DRUCKREY et al., 1966; IVANKOVIC und DRUCKREY, 1968; VON KREYBIG, 1968). Neben diesen schon äußerlich erkennbaren Effekten steht die Wirkung von ENU auf das Gehirn der Neonaten im Mittelpunkt.

Teratogene Wirkungen auf das ZNS sind abhängig von der Dosis und vom Zeitpunkt der ENU-Applikation. Allgemein kann man feststellen, daß das Gehirn empfindlicher als das Rückenmark, und das Rückenmark empfindlicher als das periphere Nervensystem ist.

Im Gehirn sind die Großhirnhemisphären die Prädispositionsstelle für Läsionen. WECHSLER (1972) fand nach einer Dosis von 80mg/kg KGW, die er trächtigen Ratten am 12. Gestationstag i.v. applizierte, bei den Nachkommen Agenesie des Bulbus olfactorius und schwere Hypoplasien der Hemisphären, während andere Gehirnpartien, einschließlich des Kleinhirns, normal oder weniger geschädigt erschienen.

Im selben Versuch stellte WECHSLER (1972) einen Unterschied zwischen ENU-Wirkungen zu verschiedenen Applikationszeitpunkten fest. Injizierte er das teratogene Agens drei Tage später als oben beschrieben, also am 15. Gestationstag, so war lediglich eine markante Verlangsamung der ansonsten normal ablaufenden Hemisphärenentwicklung, aber keine eindeutige pathologische Veränderung zu beobachten.

Auch in der Folgezeit, am 20. und 22. Tag der Gestation, war es noch möglich, das Gehirn durch ENU-Gabe zu schädigen. Zu diesem späten Zeitpunkt kam es dann aber lediglich zu geringfügigen Läsionen. Selbst bei neugeborenen Ratten, deren ZNS-Genese bekanntlich noch nicht völlig abgeschlossen ist, traten nach höheren ENU-Dosen Gehirnschäden auf.

Die Mißbildungen im Gehirn sind auf akute zytotoxische Effekte zurückzuführen, die sich bereits 3-6h nach der Applikation von ENU an das trächtige Muttertier manifestieren (WECHSLER, 1972). Es ließ sich beobachten, daß

die Läsionen bevorzugt zwischen dem Ependym der Lateralventrikel und den Zellen des primitiven Cortex lokalisiert sind (WECHSLER, 1972). Diese subependymale Zellschicht liegt entlang der lateralen Begrenzungen der Lateralventrikel und ist ein Stammgebiet von Gliazellen und Mikroneuronen (BOSCH, 1977).

FUJITA (1966) erklärte die Bevorzugung dieser Lokalisation mit der Tatsache, daß die meisten der in der subependymalen Zone liegenden Zellen sich in der S-Phase oder im Übergang von der S-zur M-Phase (YOSHIDA et al., 1984) des Zellzyklus befinden. Zellen in dieser Phase sind als de facto proliferierende Zellen aufzufassen. Das bedeutet, daß ENU selektiv die Degeneration proliferierender Zellen bewirkt. Zellen im Stadium der Interphase sind also weniger empfänglich.

An der DNA führt ENU, wie in 2.1.1. dargelegt, zu bestimmten molekularbiologischen Veränderungen. KLEIHUES (1969) zeigte, daß die intraperitoneale Injektion von MNU (Methyl-Nitroso-Urea) in einer Dosis von 50 bzw. 100mg/kg KGW bei adulten Wistar-Ratten innerhalb von 6h zu einer fast völligen Blockade der DNA-Synthese führt. Die dabei festgestellten pathologischen Veränderungen der proliferierenden Zellen sind Zellpyknose, Karyorhexis und Zellnekrose.

Die transplazentare Inokulation von ENU zwischen dem 13. und dem 18. Gestationstag mit Dosen zwischen 20 und 80mg/kg KGW führt zu ganz ähnlichen pathologischen Ereignissen (GOERTTLER et al., 1970; OYANAGI et al., 1986). Die in diesem Zeitraum der fetalen Entwicklung ablaufende Organogenese mit hoher DNA-Syntheserate und kurzen Proliferationszyklen erklärt die hohe Vulnerabilität des Fetus gegenüber den teratogenen Einflüssen von ENU.

FUJIWARA (1980) beschrieb den zeitlichen Ablauf der zytotoxischen Effekte von ENU auf das ZNS von Rattenembryonen. Demnach ist bereits eine Stunde nach Applikation von 40 bzw. 80mg/kg KGW am 13. oder 15. Gestationstag eine Reduzierung der mitotischen Aktivität in der

innersten Schicht der Ventrikelzone (VZ) festzustellen. Nach zwei Stunden erkennt man die ersten pyknotischen Zellen in der VZ, und nach Ablauf von sechs Stunden sind massive Degenerationen in der VZ, der sogenannten DNA-synthetisierenden Zone (FUJIWARA, 1980), zu beobachten. Schließlich entdeckt man nach 12 Stunden degenerierte Zellen im Ventrikellumen, die durch eine Rupturstelle in der VZ dort hinein gelangt sind. 24 Stunden im Anschluß an die ENU-Applikation zeigen sich erste Anzeichen einer Gewebereparation in Form von wieder einsetzenden Mitosen an der ventrikulären Oberfläche.

Die Eliminierung degenerierter Zellen und von Zelldetritus erfolgt durch makrophagenähnliche Zellen im sogenannten "extra-cellular space" (IKUTA et al., 1983, 1984; OYANAGI et al., 1986).

Somit kommt die teratogene Wirkung von ENU nach FUJIWARA (1980) wahrscheinlich in erster Linie durch den oben beschriebenen Verlust proliferierender Zellen in der VZ zustande. Diese quantitative Verminderung neuronaler Vorläuferzellen führt zu einer Verschmälerung des Cortex, die auch postnatal erhalten bleibt (HALLAS und DAS, 1978). Allerdings darf man dabei nicht übersehen, daß ein intensiver Zelluntergang zum physiologischen ontogenetischen Ablauf der Gehirnentwicklung gehört. Erfährt dieser Zelluntergang aber eine übermäßige Steigerung, dann unterliegt die Gehirnentwicklung pathologischen Veränderungen, die sich als teratogene Schäden manifestieren. So sind postnatal schwere Hypoplasien der Hemisphären (WECHSLER, 1972), "micrencephaly" und Hydrocephalie (KOYAMA, 1970; KOYAMA et al., 1972) beobachtet worden. Ob neben dem akut zytotoxischen Effekt auch mutagene Veränderungen an der teratogenen Wirkung von ENU beteiligt sind, und, wenn ja, wie sie sich darstellen, ist noch ungeklärt.

2.1.3. Kanzerogene Wirkungen von ENU

Obwohl N-Nitroso-Verbindungen auch mutagene und teratogene Eigenschaften haben, ist die Karzinogenität ihre bedeutendste biologische Aktivität.

Den ersten Nachweis für die tumorinduzierenden Eigenschaften einer N-Nitroso-Verbindung (Dimethylnitrosamin) erbrachten MAGEE und BARNES (1956). Seitdem wurden mehr als 1400 Arbeiten über die Analyse, Bildung, Chemie, Biochemie, den Metabolismus und die biologischen Wirkungen von N-Nitroso-Verbindungen publiziert (PREUSS-MANN, 1984).

Die starke Kanzerogenität vieler N-Nitroso-Verbindungen ist wohl der Hauptgrund für dieses auffallende wissenschaftliche Interesse. Weitere Ursachen sind in der Organspezifität, dem Auftreten einzelner N-Nitroso-Verbindungen in der Umwelt des Menschen, der Möglichkeit, diese starken Kanzerogene in vivo aus Vorläuferaminen und nitrosierenden Agenzien zu bilden, und in der Verfügbarkeit und leichten Synthese vieler Verbindungen zu suchen.

Mehr als 300 verschiedene N-Nitroso-Verbindungen wurden auf ihre Karzinogenität getestet. Bei ca. 90% von ihnen fand man karzinogene Aktivität.

Charakteristisch für die N-Nitroso-Verbindungen sind die Organspezifität der karzinogenen Effekte (organotrope Effekte), die Dosispezifität und die phasenspezifische Wirkung.

Organspezifität bedeutet in diesem Fall, daß sich bei der Ratte das fetale ZNS deutlich empfindlicher als die übrigen fetalen Organe gegenüber der transplazentaren Wirkung von ENU erweist.

Die Organspezifität wird durch die jeweilige chemische Struktur einer N-Nitroso-Verbindung bestimmt. Über die Ursachen der Organspezifität s. weiter unten.

Bevorzugte Stellen bei der Tumorinduktion sind also Gehirn und Nervensystem. Aber auch im Verdauungstrakt, dem Atmungssystem, dem Pankreas, dem hämatopoetischen

System, dem Herz und der Haut wurden schon Neoplasien, die auf die transplazentare Wirkung von ENU zurückzuführen sind, gefunden.

Die für die Tumorinduktion nötigen Dosen von N-Nitroso-Verbindungen sind niedrig. Es reichen schon einmalige Dosen von 1mg/kg KGW aus. Allerdings läßt sich feststellen, daß die Inzidenz der experimentell erzeugten Neoplasien direkt proportional zur Dosis des Karzinogens ist. Mit Zunahme der Dosis steigt außerdem die Tumormultiplizität an, während gleichzeitig die mittlere Überlebenszeit und die mittlere Latenzzeit abnimmt (SVENBERG et al., 1972).

Die Frage, welche der möglichen Veränderungen der DNA oder anderer Zellbestandteile tatsächlich für die Tumorentstehung entscheidend ist, hat außerordentliche Bedeutung.

1974 wiesen GOTH und RAJEWSKY und KLEIHUES et al. nach, daß 0-6-Ethyl-Guanin aus Gehirn-DNA viel langsamer entfernt wird als aus Leber-DNA. Die unterschiedliche Fähigkeit der Gewebe, 0-6-Ethyl-Guanin aus ihrer DNA zu eliminieren, ist daher möglicherweise ein bestimmender Faktor für die Wahrscheinlichkeit einer neoplastischen Transformation.

Das Ausmaß des neurokarzinogenen Effekts von ENU hängt stark vom Entwicklungsstadium zum Zeitpunkt der transplazentaren ENU-Applikation ab (phasenspezifische Wirkung von ENU). Sein Maximum erreicht dieser Effekt während der späten Pränatal- und der frühen Postnatalperiode (MÜLLER und RAJEWSKY, 1983).

IVANKOVIC und DRUCKREY (1968) beobachteten weder nach einer ENU-Dosis von 60µg/g KGW am 1. Gestationstag noch nach einer ENU-Dosis von 20µg/g KGW am 11. Lebenstag Gehirntumoren. Nur 3 von 18 Tieren entwickelten neurodegenerale Tumoren nach einer Dosis von 20µg/g KGW am 12. Gestationstag. Die Tiere, die am 15. Gestationstag mit einer Dosis von 60µg/g KGW behandelt worden waren, starben jedoch alle (100%) an Gehirntumoren. Bei einer Dosis von nur 5µg/g KGW, was nur 2% der LD₅₀ für adulte

Ratten entspricht, ebenfalls am 15. Gestationstag, lag der Anteil von Ratten mit Tumoren sogar noch bei 62,5%. Die Tatsache, daß die Tumorfrequenz stark abnimmt, je später ENU im fetalen bzw. im neonatalen Leben appliziert wird, läßt sich damit erklären, daß mit zunehmendem Lebensalter die Zahl der neuronalen Vorläuferzellen mit ihrer großen Proliferationskapazität immer mehr abnimmt. Warum aber das Auftreten von Tumoren bei Applikation vor dem 15. Gestationstag so niedrig ist, hängt nicht mit der Anwesenheit vieler Vorläuferzellen in diesem Entwicklungsstadium zusammen.

MÜLLER und RAJEWSKY (1983) zeigten, daß der Anteil ethylierter DNA nach transplazentarer ENU-Applikation unabhängig vom Zeitpunkt der Applikation ist. Gleich ob prä- oder postnatal (die Tage 11 a.p. bis 102 p.n. wurden untersucht), die Menge ethylierter DNA, bestimmt mit immunanalytischen Verfahren war immer konstant.

Bei der Ergründung der Phasenspezifität von ENU, die frühe wirksame Phase betreffend, muß man die enzymatische Eliminierung der durch ENU-Wirkung ethylierten DNA beachten. MÜLLER und RAJEWSKY (1983) schreiben dem bei dieser Eliminierung agierenden Enzym die Eigenschaften einer Alkyltransferase zu. Ob nun die Aktivität dieses Enzyms abhängig ist vom Entwicklungsstadium, ist noch ungeklärt. Träfe es aber zu, daß dieses Enzym in der frühen Pränatalperiode wirksam ist und dann, etwa ab dem 15. Tag a.p., seine Aktivität, aus welchem Grund auch immer, reduziert, so hätte man eine mögliche Erklärung für die geringe Tumorfrequenz vor dem 15. Gestationstag bzw. für das Ansteigen in der späten Pränatalphase. Schon 1974 wiesen GOTH und RAJEWSKY nach, daß das Produkt der DNA-Ethylierung (O-6-Ethyl-Guanin) aus Lebergewebe schneller eliminiert wird als aus dem Gehirn. Auch CHANG et al. (1980) beschrieben die selektive Persistenz von O-6-Ethyl-Guanin in Gehirn-DNA zu einem Zeitpunkt in der späten Pränatalperiode (20. Gestationstag). Somit läßt sich der Organotropismus von ENU auf das Gehirn und damit die Wahrscheinlichkeit einer neo-

plastischen Transformation mit der langsamen enzymatischen Eliminierung von ethylierten DNA-Produkten im Gehirn erklären.

Histologische Untersuchungen der durch ENU provozierten Neoplasien ergaben, daß es sich dabei in den meisten Fällen um Oligodendrogliome handelt. NAITO et al. (1986) führten immunhistochemische Untersuchungen am Kleinhirn der Ratte durch und beobachteten, daß die Tumorzellen mit anti-Leu-7-monoklonalem Antikörper Komplexe bilden. Primitive Gliazellen in der subcorticalen Region kommen während der Ontogenese gehäuft in der Neonatalperiode vor. NAITO et al. (1986) wiesen elektronenmikroskopisch die primitive Natur dieser Zellen nach und erkannten, daß sie ebenfalls mit dem anti-Leu-7-Antikörper reagieren.

Die Koinzidenz der Eigenschaft von Oligodendrozyten und primitiven Gliazellen, mit diesem Antikörper zu reagieren, bewies ihrer Ansicht nach, daß es sich bei den Gliazellen um sogenannte "target cells" handelt.

NAITO et al. (1986) stellten ferner die Gemeinsamkeit heraus, daß sich sowohl die genannten Gliazellen, als auch die Oligodendrogliome am häufigsten in der subcorticalen Region des Kleinhirns finden lassen.

In anderen Arbeiten wiesen HOPEWELL (1975) und NAITO et al. (1984) ebenfalls die Existenz von "target cells" nach. HOPEWELL (1975) hob die Rolle der subependymalen Zellen der Lateralventrikel als "target cells" des Zerebrums, und NAITO et al. (1984) die der subpialen Zellen des Rückenmarks ebenfalls als "target cells" hervor. NAITO et al. (1984) führten dementsprechend die Altersdifferenzen bei der Empfänglichkeit des Nervensystems für die karzinogene Wirkung von ENU auf den Wechsel in der Population der "target cells" während der Entwicklung zurück. Auch BOSCH (1977) war der Ansicht, daß die subependymale Zellschicht entlang der lateralen Abgrenzungen der Lateralventrikel, die eine Quelle von Gliazellen und Mikroneuronen darstellt, die Zielgegend, "target brain tissue-area", bei der Induktion von Ge-

hirntumoren darstellt. Er fand dementsprechend auch weiter heraus, daß die meisten der experimentell erzeugten Gehirntumoren in den Hemisphären, und zwar entlang der lateralen Abgrenzungen der Lateralventrikel sowie im Hippocampus und im Bulbus olfactorius zu finden sind. In diese Gehirnregionen gelangen im Moment der Karzinogenexposition Ströme von proliferationsfähigen Zellen.

HAAG und SOUKUP (1984) führten Chromosomenanalysen von ENU-induzierten neurogenen Tumoren durch. Sie fanden deutliche Zusammenhänge von Neuroonkogenese und einer Chromosom-4-Aberration. Diese Zusammenhänge ließen sich nur bei ENU als ätiologischem Tumoragens herstellen. Nach Tumorinduktion mit aviärem Sarkomavirus beispielsweise ergaben sich keine Chromosomenabnormitäten. Verschiedene andere Studien kamen zu ganz ähnlichen Ergebnissen (AU et al., 1977; MITELMAN, 1978; CLAISSE et al., 1979).

Nach den Untersuchungen von BOSCH (1977) und KOESTNER et al. (1971) existiert eine Geschlechtsdifferenz bezüglich der Häufigkeit der Entwicklung von Gehirntumoren nach ENU-Applikation. Danach leiden männliche Versuchstiere - allerdings nicht in signifikanter Weise - etwas häufiger an diesen Neubildungen.

Bezüglich etwaiger Unterschiede zwischen verschiedenen Rattenrassen bei der Tumorinduktion durch ENU legten NAITO et al. 1982 eine Studie vor. Demnach haben alle 4 getesteten Rassen, Wistar/Furth, Long-Evans, Wistar/Furth X Long-Evans(F1) und Fischer 344, eine gleich hohe Empfänglichkeit für die Bildung von Neoplasien in Gehirn und Rückenmark nach neonatal appliziertem ENU. Die Vulnerabilität des peripheren Nervensystems ist demgegenüber bei den einzelnen Rassen unterschiedlich.

2.2. Sequenz der Gehirnveränderungen nach pränataler Applikation von ENU

Um die zeitliche Abfolge der Gehirnveränderungen nach transplazentarer ENU-Wirkung aufzuzeigen, muß man zwischen den Soforteffekten und den postnatalen Läsionen unterscheiden.

Die Soforteffekte betreffen das Gehirn des Fetus unmittelbar im Anschluß an die ENU-Applikation, die postnatalen Veränderungen treten beim neugeborenen Tier nach einer gewissen Latenzperiode in Erscheinung.

2.2.1. Soforteffekte

Als Parameter für die Soforteffekte gelten die histologischen Veränderungen, insbesondere Zelldegeneration und Nekrose, die Mitoseaktivität der Zellen sowie die Länge des Zellzyklus und die Länge seiner einzelnen Phasen.

KNOWLES (1976) untersuchte die Soforteffekte nicht nach transplazentarer ENU-Applikation bei Feten, sondern während einer 28-stündigen Periode direkt im Anschluß an die Applikation bei Neonaten. Nach Ablauf von 4-8 Stunden und nach 16-24 Stunden wurden jeweils zwei Phasen mit einerseits deutlich hohem Markierungsindex (Mitosemarkierung mit 3-H-Thymin) und andererseits starker Zelldegeneration registriert. Die meisten der degenerierten Zellen zeigten diploiden DNA-Gehalt und waren dementsprechend postmitotisch.

Damit widerlegte KNOWLES die Ergebnisse von WECHSLER (1972), der der Prädominanz der ENU-induzierten zytotoxischen Läsionen der Subependymzone (SEZ) die Eigenschaft zuschrieb, zum Zeitpunkt der Schädigung in der S-Phase des Zellzyklus, während der die DNA-Replikation abläuft, und damit besonders empfindlich zu sein.

Da sehr wenige degenerierte Zellen einen diploiden DNA-Gehalt haben, konnte es WECHSLERS Meinung nach nicht zutreffen, daß ENU die Zellen, die sich in der S-Phase

oder in der Mitose befinden, veranlaßt, zugrunde zu gehen.

Auch BOSCH (1977) bestimmte einen Abschnitt während des Zellzyklus von Neuroglioblasten, zu dem dieser infolge einer einmaligen ENU-Applikation zum Stillstand kommt. Mittels Thymidinmarkierung stellte er fest, daß die Zellen, die sich bei Einwirken der karzinogenen Noxe ENU gerade in der oder direkt vor dem Eintritt in die S-Phase befinden, selektiv geschädigt werden.

Während der Periode des Stillstands verzeichnete er jedoch noch eine geringe, aber spezifische mitotische Aktivität, was auf Reparaturprozesse an der DNA schließen läßt.

BOSCH (1977) stellte in seiner Arbeit zwei zytotoxische Effekte heraus: letaler Zellschaden und Mitosehemmung. Beide Effekte beschränken sich auf proliferierende Zellen neuraler und extraneuraler Gewebe. In seinem Versuch bestimmte er die Dauer der Mitosehemmung der SEZ-Zellen bei Ratten. 6 Stunden nach der transplazentaren ENU-Applikation beobachtete er eine totale Mitosehemmung. Im Anschluß an den Wiederbeginn der Mitosetätigkeit nach 48 Stunden waren viele abnorme Mitosefiguren zu erkennen (Brückenbildung der Chromosomen, Chromosomenbrüche). Dies deutet auf DNA-Läsionen als Ergebnis der Alkylierung hin.

Eine genaue Chronologie der Gehirnveränderungen nach transplazentarer ENU-Applikation lieferte FUJIWARA (1980). Eine Stunde nach Applikation verzeichnete er einen Rückgang der mitotischen Aktivität. Nach 2 Stunden wurden vereinzelt pyknotische Zellen beobachtet; bereits nach 3 Stunden waren die Mitosen deutlich reduziert, und es setzte eine massive Degeneration und Nekrose in der DNA-synthetisierenden Region der Subependymzone (SEZ) ein.

6 Stunden im Anschluß an die Behandlung hatten sich die degenerierten Zellen abgerundet und waren zu kleinen Zellhaufen kondensiert. Makrophagenähnliche Zellen erschienen in der Nähe der Degenerationsherde.

Nach 12 Stunden waren von den Zellen nur mehr Fragmente zu erkennen, die teilweise durch Rupturstellen ins Ventrikellumen vorgefallen waren. Nach weiteren 12 Stunden, also 24 Stunden nach der ENU-Applikation, begann erste Gewebereparation in Form von wiedereinsetzender Mitose-tätigkeit an der ventrikulären Oberfläche.

FUJIWARA (1980) beschrieb zusammenfassend die 4 Hauptmerkmale des ENU-geschädigten embryonalen Gehirns:

1. Mitosearrest, das heißt Stillstand des Zellzyklus in der G_2 -Phase, unmittelbar vor Eintreten in eine Teilung
2. Degeneration und Nekrose
3. Eliminierung der Degenerationsprodukte (makrophagenähnliche Zellen, die aus der Nachbarschaft der zugrunde gegangenen Zellen stammen, beseitigen den Zelldetritus durch Phagozytose)
4. Gewebereparation (überlebende Zellen beginnen durch mitotische Aktivität mit der Wiederherstellung der ventrikulären Oberfläche)

2.2.2. Postnatale Gehirnveränderungen

Während beim Fetus die Soforteffekte, die aus Nekrose, Kernpyknose und zeitweisem Zellzyklusstillstand bestehen, 6-48 Stunden nach ENU-Applikation beobachtet wurden, fanden KOESTNER et al. (1971), LANTOS und COX (1976), SCHIFFER et al. (1978) sowie LANTOS und PILKINGTON (1979) frühe tumoröse Gehirnveränderungen ab dem zweiten Monat post natum bei den transplazentar behandelten Ratten.

Präneoplastische oder prämaligne Läsionen bei Jungtieren sind die Vorläufer der eigentlichen Neoplasien. SHABAD (1973, zitiert nach LANTOS und PILKINGTON, 1979) definierte diese Vorstufen als "mikroskopische, oft multiple Foci von nicht-entzündlichem atypischen Wachstum und differenzierten Epithels".

SCHIFFER et al. (1980) führten eine Studie durch, um die

Vorgänge im Intervall zwischen den im Abschnitt 2.2.1. dieser Arbeit beschriebenen frühesten Veränderungen und dem Zeitpunkt 8 Wochen p.n. zu klären. Demnach finden sich bereits ab dem 30. Tag p.n. häufiger Mitosen in der SEZ bei ENU-behandelten Tieren als bei unbehandelten Kontrolltieren. Ebenfalls vom 30. Tag an werden zirkumskripte oder diffuse Zellhyperplasien in der paraventriculär gelegenen weißen Substanz beobachtet.

Während des zweiten Lebensmonats erscheinen reaktive Astrozyten, und die Läsionen erhalten das Aussehen der sogenannten frühen neoplastischen Proliferationen, "early neoplastic proliferations" (ENP), (SCHIFFER et al. 1980). Dies belegt, daß die Latenzperiode, das heißt die Zeit zwischen dem Einwirken der Noxe und dem Auftreten der Neoplasien, bei ENU als tumorauslösendem Agens, etwa einen Monat, und nicht zwei und mehr Monate, wie andere Autoren (LANTOS, 1977; SCHIFFER et al., 1978; LANTOS und PILKINGTON, 1979) früher angenommen hatten, dauert.

Abnormes Zellwachstum von mit ENU behandelten Gehirnzellen während der Latenzperiode wurde auch bei in-vitro-Versuchen nachgewiesen. So stellten ROSCOE und CLAISSE (1976, 1978, zitiert nach LANTOS und PILKINGTON, 1979) fest, daß Zellkulturen von mit ENU behandelten Gehirnzellen in Agar wuchsen und sogar Tumoren bildeten, wenn sie wieder in Ratten reinjiziert wurden. 1976 beschrieb LANTOS kleine Zellansammlungen in der SEZ, die 8 Wochen p.n. auftraten, als früheste Läsionen. Er stellte ferner fest, daß transformierte SEZ-Stammzellen entweder in situ verbleiben oder in die weiße Substanz hinein auswandern, wo sie sich zu Mischgliomen und Oligodendrogliomen oder seltener zu Astrozytomen weiterentwickeln. SCHIFFER et al. (1978) systematisierten erstmals die schon erwähnten frühen neoplastischen Veränderungen. Die einzelnen Stadien können danach wie folgt aufgelistet werden:

1. Frühstadiumproliferationen (ENP) oder Oligodendrofofi
2. Mikrotumoren (Oligodendroglione)
3. Makrotumoren (Oligodendroglione)
4. Neurinome (später auftretend).

Die Größenordnungen liegen bei kleiner als 300 μm für die ENP, zwischen 300 und 500 μm für die Mikrotumoren und größer als 500 μm für die Makrotumoren.

Die ENP erscheinen im 2. Monat p.n. und bleiben bis 3,5 Monate p.n. erhalten. Sie sind in der paraventriculär gelegenen weißen Substanz lokalisiert. Vornehmlich liegen sie subependymal im dorsolateralen Winkel der Seitenventrikel. Manche der Veränderungen bestehen aus einem einzelnen Herd, andere aus mehreren. Die Zellen sind nicht näher identifizierbare Gliazellen, die SCHIFFER et al. (1978) in drei Gruppen einteilten:

1. Zellen vom Astrozytentyp mit großem blasenartigen Kern
2. Zellen vom Oligodendrozytentyp mit kleinem dunklen Kern
3. Zellen mit deformiertem Kern.

Als Kontaktstelle zwischen den Zellen wurden elektronenmikroskopisch zwei dichte Linien registriert, die durch einen Raum von etwa 20 nm voneinander getrennt sind.

LANTOS und PILKINGTON (1979) berichteten von zahlreichen Mitosen in den ENP, während SCHIFFER et al. (1978) nur eine geringfügige mitotische Aktivität beobachteten.

Neben den Frühstadiumproliferationen gibt es noch andere Hinweise auf einen pathologischen Prozeß im 2. und 3. Monat p.n.. Dazu zählen Irregularitäten in der Gewebearchitektur der betroffenen Gebiete, gelegentlich auftretende Erythrozyten, einige wenige mehrkernige Riesenzellen und sogenannte reaktive Zellen (Astrozyten und Mikroglia) (SCHIFFER et al., 1978; LANTOS und PILKINGTON, 1979).

Mikrotumoren erscheinen nach Untersuchungen von SCHIFFER et al. (1978) zwischen dem 2. und 5. Lebensmonat. Sie

setzen sich aus den gleichen Zellen zusammen wie die ENP, zeigen aber eine höhere Zelldichte und häufiger Mitosen. Reaktive Astrozyten kommen an der Peripherie der Neoplasien vor. Die häufigste Lokalisation der Mikrotumoren ist der dorsolaterale Winkel der Seitenventrikel zwischen Corpus callosum und Nucleus caudatus. Die Vermutung, daß die meisten, wenn nicht alle cerebralen Gliome von undifferenzierten SEZ-Zellen abstammen (die bekanntlich die "target-cells" für den karzinogenen Stimulus darstellen), äußerten PILKINGTON und LANTOS (1979). Sie fanden bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen in allen Mikrotumoren eine beträchtliche Anzahl an undifferenzierten SEZ-Stammzellen.

Als eine andere Art früher Tumorstadien nach ENU-Applikation beschrieben SCHIFFER et al. (1978) Foci oligodendroglialer Hyperplasie, die 2,5 Monate p.n. auftraten. In ihnen wurden keine Mitosen und keine reaktiven Astrozyten gefunden. Ab dem 5. Monat p.n. gestalteten sich diese Neoplasien zu isomorphen Oligodendrogliomen aus. Auch JÄNISCH et al. (1970) beschrieben Gliome bei Ratten und Kaninchen, die ihren Ursprung von proliferierenden Oligodendrozyten nahmen.

MANDYBUR und ALVIRA (1982, zitiert nach MENNEL und SIMON, 1985) kamen zu dem Schluß, daß die oben angesprochenen Ependymome, die oft manschettenartig perivaskulär gelegen sind, wenig differenzierte Gliome mit gewissen Charakterzügen von Oligodendrogliomen darstellen.

Diese Annahme der Entstehung von ENU-induzierten Tumoren auf zwei verschiedenen Wegen, nämlich aus pluripotenten Stammzellen und aus differenzierten Gliazellen konnte von BURGER et al. (1988) widerlegt werden. Sie stellten fest, daß die Persistenz einer ependymalen Matrixzone, also das Vorhandensein einer undifferenzierten Stammzellpopulation, lediglich die Vorbedingung für die Genese von Astrozytomen, Ependymomen und gemischten Gliomen ist. Die ENU-induzierten Tumoren hingegen, die histopathologisch ausschließlich als Oligo- gliome zu

klassifizieren sind, benötigen diese pluripotenten Stammzellen zu ihrer Entwicklung nicht.

Mit anderen Worten, die selektive Induktion von Oligodendroglomen zeigt, daß diese neoplastische Transformation entweder in bereits differenzierten Gliazellen oder in Stammzellen, deren Differenzierung bereits definitiv feststeht, stattfindet.

Pathogene Faktoren, wie Haemorrhagien, Nekrosen, strukturelle Schäden des Gehirnparenchyms und hohe Mito-serate, die in den ENU-induzierten Gliomen beobachtet wurden, weisen darauf hin, daß diese Tumoren schon im frühen Stadium ihrer Entwicklung eine maligne Wachstumstendenz besitzen.

Indem PILKINGTON und LANTOS (1979) einen zellulären Pleomorphismus der Gliome beschrieben, verwiesen sie damit auf einen noch höheren Malignitätsgrad. Dies muß aber nun nach den Erkenntnissen von BURGER et al. (1988) bezweifelt werden.

3,5 Monate post natum werden nach den Untersuchungen von SCHIFFER et al. (1978) die ersten Makrotumoren mit einer Größe von mehr als 500 µm im Durchmesser gesehen. Sie zeigen prinzipiell die gleichen Charakteristika wie Mikrotumoren. Ihre Randgebiete haben morphologisch Ähnlichkeit mit den ENP. Mitosen sind zahlreich. Die Zellen im Zentrum des Tumors sehen astrozytenartig aus, das heißt, sie erscheinen besonders plasmareich. Zum Cortex und zum Hippocampus hin sind die Tumoren nicht abgegrenzt, sie wachsen diffus in der paraventrikulär gelegenen weißen Substanz. Im 6. Lebensmonat erkennt man die ersten zirkumskripten Nekrosen. Etwa gleichzeitig beginnen auch Blutgefäße, in das Tumorgewebe einzusprosssen.

2.2.3. Chronologie der Reparation von frühen Läsionen

Bei der Reparation des sich während der Neurogenese entwickelnden fetalen Rattengehirns gibt es einige histologische Besonderheiten.

Das fetale Gehirn scheint seinen Reparationsmechanismus dem Vorkommen eines riesigen extrazellulären Raums zu verdanken. In diesem, beim adulten Tier nicht mehr bestehenden Raum existieren alle Zellen ohne interzelluläre Adhäsionen. Für das adulte Gehirn sind aber gerade solche Adhäsionen charakteristisch.

Nach den Degenerationsvorgängen, die am fetalen Gehirn durch transplazentare ENU-Wirkung ausgelöst wurden, sind Phagozyten, die sich in der Flüssigkeit des extrazellulären Raums befinden, in der Lage, das degenerierte Zellmaterial vollständig zu eliminieren, ohne die in Entstehung befindlichen interzellulären Adhäsionen aufbrechen zu müssen. Im Anschluß an diese Phagozytose beginnen Zellen, die sich aus Matrixzellen differenziert haben, sukzessive mit der Restauration des geschädigten Gehirnareals.

Weder Gliose, Fibrose, abnormale Vaskularisation, noch Infiltration von Granulozyten oder Lymphozyten wurden jemals bei den Wiederherstellungsvorgängen des geschädigten fetalen Gehirns beobachtet.

Aus der Reparation resultiert letztlich ein Gehirn, das kleiner ist als ein ungeschädigtes. Besonders auffällig manifestiert sich dies in dem äußerst schmalen Vorderhirndach ab dem 21. Tag p.n. sowie dem geringen Gehirngewicht, wobei das Gehirn jedoch die histologisch normale Zellarchitektur aufweist (OYANAGI et al., 1986).

2.3. Tumor-modifizierende Faktoren

2.3.1. Effekte chemischer Verbindungen auf die Tumorentwicklung

Bereits im Jahr 1949 wurde von K.H. BAUER der Begriff Synkarzinogenese geprägt. Darunter versteht man das Zusammenwirken von zwei oder mehr Faktoren mit dem Ergebnis, daß sich Neoplasien häufiger, früher oder an einer bevorzugten Stelle entwickeln.

Daß es synergistische Wirkungsprinzipien bei der Tumorentstehung gibt, wurde inzwischen durch verschiedene Kombinationsversuche unter Beweis gestellt.

Die Interaktion von zwei verschiedenen Stoffen bei der Karzinogenese betreffend, geht man heute von der Zwei-Stadien-Theorie aus (KOKUNAI et al., 1986). Diese besagt, daß die Entwicklung mit der Initiation einsetzt (das Karzinogen setzt einen zytotoxischen Schaden), und im zweiten Stadium, der Promotionsphase, die maligne Gewebetransformation durch die Wirkung eines Agens erreicht wird, das an sich weder karzinogen noch mutagen ist.

HABS und SCHMÄHL (1980) beschäftigten sich mit den unterschiedlichen möglichen Kombinationseffekten, die man bei der experimentellen Tumorinduzierung durch chemische Agenzien erzielen kann.

Ganz allgemein gibt es zwei Gruppen von Interaktionen. Einmal sind dies gemeinsame karzinogene Aktivitäten von zwei oder mehr chemischen Karzinogenen und zum anderen modifizierende Effekte von nicht-karzinogenen Substanzen.

Zwei oder mehr zur Tumorentstehung führende Stoffe können jeder für sich lokal oder systemisch reagieren, metabolische Aktivierung benötigen oder nicht benötigen und unilokale oder multilokale Tumoren induzieren. Dabei ist die karzinogene Potenz eines der beiden Agenzien bereits ausreichend.

In experimentellen Karzinogenesetests sind folgende

Wirkungsweisen beim Zusammenwirken zweier Stoffe (A und B, beide chemische Karzinogene) festgestellt worden (HABS und SCHMÄHL, 1980):

1. A und B agieren in verschiedenen Organen unabhängig voneinander -> kompetitive Wirkung
2. A und B agieren in demselben Organ unabhängig voneinander -> unabhängige, additive Wirkung
3. B induziert die metabolische Aktivierung von A (im Sinne einer Toxifizierung) -> synergistische Effekte (stärker als additive)
4. B hemmt die metabolische Aktivierung von A -> inhibitorische Effekte.

Dabei ist zu beachten, daß die organspezifischen Interaktionen abhängig sind von der Anzahl der Einzeldosen und von der Gesamtdosis, von der Reihenfolge der applizierten Verbindungen und von der Zeitspanne zwischen den Applikationen der verschiedenen Verbindungen.

Wie die Mechanismen bei diesen Kombinationseffekten exakt ablaufen, ist noch nicht eindeutig geklärt. HABS und SCHMÄHL (1980) vermuteten aber bestimmte Enzymwirkungen, also enzyminduzierende oder -hemmende Effekte, kompetitive oder nicht-kompetitive Hemmungen von Enzymsubstraten sowie Veränderungen der Zellteilungsrate und entsprechend der zellspezifischen Proteinsynthese.

Viele Versuche demonstrieren den Einfluß verschiedener modifizierender Stoffe auf die Wirkung von chemischen Karzinogenen. Beispielsweise stellte man (HABS und SCHMÄHL, 1980) nach der Gabe von Methylnitroso-harnstoff (MNU) und Benzpyren an Hamster synergistische karzinogene Effekte bzgl. Tumorentstehung im Respirationstrakt fest. Ein weiteres Beispiel für eine promovierende Wirkung ist die gleichzeitige Applikation von MNU und Cyclamat an Ratten, was zu einem Ansteigen der Tumorfrequenz in der Harnblase führte. Dagegen konnte nachgewiesen werden, daß Diethylnitrosamin (DENA) - ebenfalls ein chemisches Karzinogen - in Kombination mit Äthanol eine weniger starke hepatokarzinogene Wirkung hat als DENA allein. Hier liegt demnach ein Beispiel für einen

inhibitorischen Effekt vor.

Verwendet man bei solchen kombinierten Karzinogeneseuntersuchungen nur Stoffe, die karzinogen wirken, so sind die zu erwartenden Effekte entweder additiver oder synergistischer Natur.

LIJINSKY et al. (1983) verwendeten in ihren Kombinationsexperimenten fünf verschiedene, stark karzinogen wirksame N-Nitroso-Verbindungen. Die erzielten Wirkungen wurden jeweils über die Parameter Tumorfrequenz und Mortalitätsrate bestimmt. Nur bei einer einzigen Kombination von drei bestimmten Verbindungen miteinander wurde eine höhere Mortalität erreicht als jedes der drei Karzinogene für sich allein erzielte. Das bedeutet, daß jedes dieser starken Agenzien allein stärker karzinogen wirkt als eine Kombination von mehreren.

LAERUM und RAJEWSKY hatten schon 1975 festgestellt, daß Zellen fetaler Rattengehirne, die zuvor transplazentar mit ENU behandelt worden waren, in der Zellkultur Kolonien bilden und 200 Tage nach Reinjektion in Ratten karzinogene Wirkung zeigten.

KOKUNAI et al. (1986) behandelten Rattenfeteten ebenfalls transplazentar am 18. Gestationstag mit 50 mg ENU/kg Körpergewicht und transferierten 72 Stunden später Gehirnzellen, deren glialer Ursprung vorher immunhistochemisch abgesichert worden war, in eine Zellkultur. Dort wurden sie dann mit 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) behandelt. TPA ist das wirksame Agens der Ester von Diterpenalkoholphorbol, das wiederum für experimentelle Zwecke aus der Pflanze *Croton tiglium* isoliert wird.

Als Ergebnis erschien die maligne Transformation bei den zusätzlich mit TPA behandelten Zellen früher als in der TPA-unbehandelten Gruppe. Parameter der Wirkung waren dabei zelluläre Morphologie, Koloniebildung und Tumorfrequenz *in vivo*.

Es ist demnach wahrscheinlich, daß TPA als Promotor bei ENU-induzierten Tumoren wirksam ist.

Solche oben beschriebenen Kombinationsversuche sind auch

deshalb von besonderer Relevanz, weil der Mensch - im Gegensatz zum Versuchstier - in seiner Umwelt täglich sehr vielen Fremdstoffen ausgesetzt ist, von denen eine große Anzahl karzinogene Eigenschaften besitzt.

2.3.2. Wirkung von Opioidantagonisten auf das Wachstum bestehender Tumoren

Die neurophysiologischen Wirkungen der Opiode, wie z.B. Analgesie und Verhaltensänderungen sind seit längerem bekannt. Opiode haben aber auch Einfluß auf die Sekretion von Hormonen. So werden durch Opioidwirkung die Prolaktin- und die STH-Sekretion stimuliert und die Gonadotropin- sowie die Thyreotropinsekretion gehemmt (AYLSWORTH et al., 1979).

Die Entwicklung und das Wachstum von Mammatumoren ist mit Prolaktin und Gonadotropinen positiv korreliert. AYLSWORTH et al. (1979) setzten bei einer Untersuchung den Opioidantagonisten Naltrexone (NX) ein und konnten zeigen, daß NX chemisch induzierte, bereits etablierte Mammatumoren über die Hemmung von Prolaktin und Gonadotropinen bremsen kann. Im Versuch dauerte diese Wachstumshemmung aber nur solange an, bis die NX-Behandlung beendet wurde. Danach erfolgte wieder ein ebenso rasches Tumorstadium wie bei den NX-unbehandelten Kontrolltieren.

ZAGON und MCLAUGHLIN (1981a, 1981b, 1983a, 1983b, 1984a, 1985 und 1987), ZAGON et al. (1985) sowie MCLAUGHLIN und ZAGON (1987) führten verschiedene Studien über die Wirkungen von Opioidantagonisten auf transplantierte Tumoren durch.

Sie etablierten Tumorknoten durch Inokulation von 10^6 S20Y-Neuroblastomzellen. Als Versuchstiere verwendeten sie A/JAX-Mäuse, in einem weiteren Versuchsansatz athymische Nacktmäuse. Bei ihren Untersuchungen stellten sie fest, daß NX-Behandlung von Mäusen mit Neuroblastomtransplantaten die Lebenszeit deutlich verlängert. Die

Neuroblastome wuchsen langsamer als bei NX-unbehandelten Tieren.

ZAGON und MCLAUGHLIN (1981a) waren nach ersten Untersuchungen der Ansicht, daß die Überlebenszeit mit steigender NX-Dosis immer länger werde.

Obwohl letzteres kurz darauf von denselben Autoren widerlegt wurde, war doch erkannt, daß NX ein effektives Agens bei der Modulation von Neoplasien darstellt.

1981 führten ZAGON und MCLAUGHLIN einen Versuch durch, bei dem sie Heroinbehandlung und NX-Behandlung bei Mäusen mit Neuroblastomen kombinierten (1981b). Dabei stellten sie fest, daß NX die antineoplastische Wirkung von Heroin auf die Tumoren, nämlich Hemmung des Wachstums und Verlängerung der Überlebenszeit blockierte. Die wachstumsmodifizierenden Wirkungen von Heroin wurden deshalb untersucht, da Morphin und seine Derivate in der Tumorthherapie schon seit langem als narkotisches Analgetikum verwendet wird. Es ist also davon auszugehen (ZAGON und MCLAUGHLIN, 1981b), daß die S20Y-Neuroblastomzellen Opioidrezeptoren besitzen und über die Stimulierung bzw. Hemmung dieser Rezeptoren in ihrem Wachstum beeinflussbar sind.

Die oben genannten Autoren erklärten die antineoplastische Wirkung von NX folgendermaßen (ZAGON und MCLAUGHLIN, 1983a): Chronische Behandlung mit niedrigen Dosen von NX (0,1 mg/kg Körpergewicht/Tag) führt dazu, daß an den Neuroblastomzellen mehr Bindungsstellen für Opiode vorhanden sind. Dadurch entsteht eine übergroße Sensibilität des Tumorgewebes für körpereigenes bzw. appliziertes Endorphin. Wenn nun nach einer gewissen Zeit die NX-Behandlung abgebrochen wird, kommt es im Rahmen der sich entwickelnden Abhängigkeit zu einer Wachstumsminderung des Tumorgewebes.

Bei der spezifischen Wirkung von NX auf die Tumorzellen spielt nicht nur die NX-Dosis, sondern auch die Dauer der Opioidrezeptorblockade eine bedeutende Rolle: ZAGON und MCLAUGHLIN stellten 1983 (b) und 1984 (a) fest, daß eine tägliche Gabe von 0,1 mg NX/kg Körpergewicht einen

inhibitorischen Effekt auf die Tumorentwicklung hat, während 10 mg /kg Körpergewicht zu einer geringeren Überlebenszeit und zu einem beschleunigten Wachstum, also generell zu einer wachstumsstimulierenden Wirkung führen. Damit wurde deutlich, daß - abhängig von der Dosis - NX sowohl hemmende als auch fördernde Wirkungen auf das Wachstum experimenteller Tumoren hat. Die Höhe der Dosis sowie die Häufigkeit der Applikationen ist verantwortlich für die Dauer der Rezeptorblockade.

So demonstrierten ZAGON und MCLAUGHLIN 1984 (a), daß eine Applikation von 0,1 mg NX/kg Körpergewicht einmal täglich zu einer etwa 10-stündigen Rezeptorblockade führt, die Gabe von 0,1 mg NX/kg Körpergewicht in jeweils 6 Stunden Abstand dagegen die Rezeptoren für 24 Stunden zu blockieren vermag. Die 10-stündige Blockade führt zu einer Abnahme der Tumorfrequenz, zu einer Verlängerung der Latenzperiode bis zum Auftreten sichtbarer Knoten sowie zu einer längeren Überlebenszeit der Tumorträger, also generell zu hemmenden Einflüssen. Bei der 24-stündigen Blockade kommt es dagegen zu einer Erhöhung der Tumorzinzidenz und zu deutlich kürzerer Überlebenszeit als bei den Kontrollen, das heißt zu einer tumorfördernden Wirkung. Dabei ist es interessant zu wissen, daß die Dosen 0,1 mg NX/kg Körpergewicht 0,02 % und 10 mg/kg Körpergewicht 2 % der LD₅₀ darstellen, und beide Dosierungen nicht zu toxischen Symptomen wie Ataxie, Konvulsionen oder Kachexie führen (ZAGON und MCLAUGHLIN, 1983a, b und 1984a).

Exogene Opioide wie Heroin und Methadon sind dafür bekannt, daß sie die Immunität herabsetzen. Daß auch endogene Opioide bestimmte Einflüsse auf das Immungeschehen haben, konnte bereits von verschiedenen Autoren nachgewiesen werden.

So sind sowohl stimulierende als auch suppressive Wirkungen auf die Lymphozytenproliferation und auf Antikörper und natürliche Killerzellen bekannt (MILLER et al., 1983 und 1984; MCCAIN et al., 1982; zitiert nach ZAGON und MCLAUGHLIN 1987).

1987 legten ZAGON und MCLAUGHLIN eine Studie vor, um die Rolle der Beeinflussung der T-Lymphozyten-vermittelten Immunität durch Opioidantagonisten hinsichtlich der Modulation der Tumorentwicklung aufzuzeigen. Bei athymischen Nacktmäusen gelang es nicht, nach Inokulation von Neuroblastomzellen das Auftreten von Tumorknoten durch eine Applikation von 0,1 mg NX/kg Körpergewicht deutlich zu reduzieren. Es kam lediglich zu einer Verlängerung der Latenzzeit. Dies ließ die Autoren darauf schließen, daß gewisse Effekte von NX durch T-Lymphozyten vermittelt werden.

Bezüglich der durch endogene Opiode vermittelten Immunreaktion auf das tumoröse Geschehen fand MURGO (1985) einen antineoplastischen Effekt von Methionin-Enkephalin. Der Autor machte seine Untersuchungen an C57BL/6J-Mäusen, die mit B16-BL6-Melanomzellen inokuliert worden waren. Eine Dosis von 50 µg/kg Körpergewicht für die Dauer von 7 oder 14 Tagen hemmte das Melanomwachstum. Dieser tumorhemmende Effekt konnte mit Naloxone aufgehoben werden. Naloxone alleine (ohne vorherige [Met]-Enkephalin-Gabe) hatte dagegen keinen Einfluß auf die Tumorentwicklung.

Da in vitro [Met]-Enkephalin die zellulären Immunfunktionen und die Killerzellen stimulieren kann, nehmen die Autoren an, daß auch in vivo eine Steigerung der Immunantwort auf Tumorzellen mittels [Met]-Enkephalin zu erreichen ist.

In einer Folgestudie untersuchte MURGO (1986) die Wirkung zweier Streßhormone auf das Tumorwachstum. Er setzte dabei erneut [Met]-Enkephalin und als zweites Agens Kortikosteron ein. Die Gabe von [Met]-Enkephalin ließ das Thymusgewicht ansteigen und hemmte das Melanomwachstum. Kortikosteron bedingte eine Thymusinvolutions, danach eine Thymushypertrophie und hemmte ebenfalls das Melanomwachstum. Eine Kombination beider Verbindungen führte auch, wie jede der beiden Substanzen für sich, zu suppressiven Wirkungen auf das Tumorwachstum.

ZAGON und MCLAUGHLIN (1985) studierten die Unterschiede

von (+)- und (-)-Isomeren des Naltrexone (NX) in bezug auf die tumormodifizierende Wirkung. Sie zeigten, daß der antineoplastische Effekt von NX stereospezifisch ist. Nur das (-)-Isomer besitzt tumorhemmende Eigenschaften.

Bei der Opioidrezeptorblockade ist es entscheidend, welcher Rezeptortyp davon betroffen ist. μ -Rezeptoren scheinen in Hinsicht auf Tumormodulation keine Rolle zu spielen. ZAGON und MCLAUGHLIN (1985) setzten als selektiven μ -Rezeptor-Antagonisten β -Funaltrexamine ein. Die Versuchsmäuse waren zuvor mit S20Y-Neuroblastomzellen inokuliert worden. Gegenüber den Kontrollen zeigte sich keine veränderte Tumorantwort. Die Autoren schlossen daraus, daß μ -Rezeptoren nicht an den tumormodifizierenden Ereignissen beteiligt sind. In Anbetracht der früheren, teils kontroversen Ergebnisse der Beeinflussung des Tumorwachstums durch Naltrexone kommt diesem Befund jedoch eine beschränkte Bedeutung zu.

Die Rolle von endogenen Opioiden und deren Rezeptoren bei menschlichen Tumoren untersuchten MCLAUGHLIN und ZAGON (1987) sowie KIKUCHI et al. (1987). Letztere verwendeten menschliche Ovarialkarzinomzellen, die sie einerseits in vitro mit NX inkubierten und andererseits in Nacktmäuse inokulierten, worauf sie eine NX-Behandlung folgen ließen. Beim in-vitro-Versuch wurde das Zellwachstum durch NX gestoppt; die Mäuse wiesen kleinere Tumoren und eine längere Überlebenszeit als Kontrolltiere auf. NX hemmt demnach auch die Proliferation von menschlichen Ovarialkarzinomen.

KIKUCHI et al. (1987) äußerten erstmals die Vermutung, daß die durch NX verursachte Wachstumshemmung auch über andere Mechanismen als über die Opioidrezeptorblockade ablaufen könnte. Solche Mechanismen sind jedoch noch ungeklärt.

In ihrer jüngsten Arbeit über die Wirkung von endogenen Opioiden auf die Tumorentwicklung transplantierten MCLAUGHLIN und ZAGON (1987) menschliche Neuroblastomzellen in Nacktmäuse. Nach der Tumorzellinokulation erhielten

die Mäuse NX in einer Dosis, die zu einer 6-8 Stunden anhaltenden Rezeptorblockade führte. Neben dem bereits bekannten Ergebnis einer verlängerten Latenzperiode und einer längeren Überlebenszeit kamen sie zusätzlich zu einem neuen Resultat. Die NX-Applikation führte nämlich zu einer um 148-186% höheren Opioidrezeptordichte. Außerdem erhöhte sich der im Gewebe festgestellte β -Endorphin- und [Met]-Enkephalinspiegel bei NX-Behandlung um das 2,5- bis 6,5-fache. Opioidantagonisten verursachen also eine Hochregulation der Rezeptordichte und erhöhen die Gewebespiegel von endogenen Opioiden. Diese Ergebnisse zeigen, daß das System der endogenen Opioide auch an der Wachstumsregulation menschlicher Tumoren beteiligt ist.

2.4. Die postnatal ablaufende Entwicklung der Opioidrezeptoren im Gehirn der Ratte

In allen Regionen des Gehirns gilt das Vorkommen von Opioidrezeptoren als gesichert.

Die Rezeptoren vermitteln die biologischen Effekte von drei Familien endogener Opioidpeptide (Enkephaline, Endorphine, Dynorphine), die sowohl in Neuronen von ZNS und Peripherie als auch in den endokrinen Drüsen lokalisiert sind.

Autoradiographische Untersuchungen haben ergeben, daß die einzelnen Opioidrezeptortypen während der Ontogenese zu verschiedenen Zeitpunkten erstmals auftreten, und ihr jeweiliges Vorhandensein im Laufe der Entwicklung wechselt (KORNBLUM et al., 1987a).

Diese alternierende Präsenz der Rezeptoren hat zu der Hypothese geführt, daß endogene Opiate, die sogenannten Opiode, und die entsprechenden Rezeptoren bei embryonalen bzw. fetalen und neonatalen Tieren andere funktionelle Rollen besitzen als bei Adulten. Es gibt diesbezüglich einige Erkenntnisse, die darauf hinzielen, daß die Opiode selbst in die Entwicklung des ZNS modulierend eingreifen.

Die im Gehirn vorkommenden Rezeptoren werden pharmakologisch in verschiedene Typen unterteilt. Man unterscheidet μ -, κ - und δ -Rezeptoren.

Bis zu den Untersuchungen von KORNBLUM et al. (1987a) war unbekannt, welche speziellen Rezeptortypen in welchen Entwicklungsphasen auftreten. Die genannten Autoren führten Studien durch, um mittels autoradiographischer Methoden die Verteilung der μ -, κ - und δ -Rezeptoren in sich entwickelnden und adulten Gehirnen zu untersuchen. Die dabei beobachteten ontogenetischen Veränderungen der in Autoradiographien ermittelten Verteilungsmuster von isotoopenmarkierten Opioiden sind laut KORNBLUM et al. (1987a) Ausdruck von Veränderungen in der Anzahl der Rezeptoren, das heißt der Rezeptordichte.

Im adulten Rattengehirn ist die Verteilung der μ - und δ -

Rezeptoren, die KORNBLUM et al. (1987a) beobachtet haben, ähnlich der, die andere Autoren (z.B. PETRILLO et al., 1982) beschrieben.

Generell können die entwicklungsbedingten Veränderungen im Auftreten der einzelnen Rezeptortypen wie folgt zusammengefaßt werden: Während der frühen Neonatalperiode sind bereits μ - und k -Rezeptoren vorhanden, wohingegen die δ -Rezeptoren erst erheblich später erscheinen. Die Dichte der k -Rezeptoren bleibt während der gesamten Entwicklung relativ konstant. μ -Rezeptoren zeigen in der Ontogenese wechselnde Dichte, δ -Rezeptoren sind zum Geburtszeitpunkt in geringer Anzahl vorhanden, nehmen aber ab der 3. Woche stark zu.

Daraus kann geschlossen werden, daß μ - und k -Rezeptoren aufgrund ihres frühen Erscheinens als Mediatoren für die entwicklungsphysiologischen Aktionen der entsprechenden Opiode in Betracht kommen.

In den einzelnen Gehirnregionen erfolgt die Ontogenese der Rezeptoren wie nachstehend beschrieben (KORNBLUM et al. 1987a):

1. Telencephalon

Im Bulbus olfactorius ist bei der Geburt eine sehr hohe Dichte an μ -Rezeptoren festzustellen, zwischen Tag 2 und Tag 13 nimmt die Dichte ab. Die Dichte der anderen Rezeptortypen ist nicht annähernd so groß wie die der μ -Rezeptoren. Auch in den Kerngebieten des Telencephalons herrscht bei Geburt ein hoher Besatz mit μ -Rezeptoren. Dies gilt insbesondere für den Nuc. accumbus medialis und den Nuc. caudatus, wobei im letzteren die Verteilung zunächst homogen, dann fleckförmig erscheint. In den ventrolateral gelegenen Kerngebieten zeigen auch die k -Rezeptoren schon hohe Dichte. Im Globus pallidus werden sowohl viele μ - als auch viele k -Rezeptoren angetroffen. Im Neocortex mit seinen Laminae I bis VI sind unmittelbar postnatal erst sehr wenige Rezeptoren zu beobachten. In der 1. Lebenswoche erscheinen μ -Rezeptoren in L I und L VI. In L III bis L V sind sie erst ab Tag 9 erkennbar und erfahren dann zwischen Tag 13 und Tag 17 einen

starken Anstieg. δ -Rezeptoren finden sich in der 1. Woche in L V und L VI, ab Tag 9 auch in L IV und L II. Zwischen Tag 13 und Tag 14 nimmt ihre Zahl generell zu. k-Rezeptoren treten im Neocortex erst ab dem 12. Tag auf. Im Hippocampus finden sich bei Geburt einige wenige μ -Rezeptoren in diffuser Verteilung, k-Rezeptoren und δ -Rezeptoren sind fast nicht nachweisbar.

2. Diencephalon

Am 2. Tag sind μ -Rezeptoren in hoher Dichte vorhanden, dann folgt ein weiterer Anstieg bis zur 2. Woche, anschließend ist wieder eine Abnahme zu verzeichnen. Ab Tag 6 ist die Dichte der k-Rezeptoren höher als die Dichte der μ -Rezeptoren. Bereits ab dem 12. Tag erreicht die Konzentration der k-Rezeptoren im Nuc. supraopticus und im Nuc. paraventricularis Werte in der Höhe, wie sie bei adulten Tieren zu finden sind. Auch im Thalamus treten μ - und k-Rezeptoren früh in Erscheinung: Im ventralen Teil kommen μ -Rezeptoren bereits zur Geburt, im dorsalen Teil ab Tag 13 vor. Die Werte adulter Tiere werden im dorsalen Bereich ab Tag 17 gefunden. In den medialen Habenulae sind μ -Rezeptoren direkt von Geburt an, k-Rezeptoren erst ab dem 6. bis 12. Tag nachweisbar.

3. Mesencephalon

Im Colliculus superior, im Zentralen Höhlengrau und im Tegmentum lassen sich μ -Rezeptoren ebenfalls bei Geburt feststellen. In der erstgenannten Region erfolgt die Verteilung ab Geburt in homogener Weise. In den folgenden 2 Wochen nimmt die Dichte dann in mehr laminierter Form zu. Die beiden anderen Strukturen zeigen bis zum 14. Tag einen Anstieg der μ -Rezeptordichte, danach jedoch eine drastische Abnahme.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß μ - und k-Rezeptoren in Gehirnen von neugeborenen Ratten vorhanden sind. Damit werden die früheren Befunde von PETRILLO et al. (1982) bestätigt.

Die Ontogenese der δ -Rezeptoren unterscheidet sich in markanter Weise von der der μ - und k-Rezeptoren. So

erscheinen δ -Rezeptoren erst in späteren Stadien der neuronalen Entwicklung, und zwar in einer anatomischen Verteilung, die der des erwachsenen Tieres ähnelt. Während der 2. und 3. Woche kommt es zu einem deutlichen Anstieg der δ -Rezeptordichte.

In früheren Untersuchungen war vermutet worden, daß μ - und δ -Rezeptoren interkonvertierende Formen ein- und desselben Rezeptortyps darstellen (BOWEN et al., 1981), und daß δ -Rezeptoren das Ergebnis einer Kopplung von μ -Rezeptoren mit Adenylatcyclase seien (KENT et al., 1982). In verschiedenen Gehirnregionen scheint auch tatsächlich diese geringe μ -Rezeptordichte mit einer hohen Konzentration von δ -Rezeptoren verknüpft zu sein. Die Ergebnisse von KORNBLUM et al. (1987a) machen jedoch deutlich, daß die Hypothese der Interkonvertierung vermutlich nicht bestätigt werden kann. Der Rückgang der μ -Rezeptordichte geschieht nämlich lange vor dem Anstieg der δ -Rezeptordichte.

Für das vorübergehende ontogenetische Auftreten der μ -Rezeptoren in den verschiedenen Gehirnregionen gibt es alternative Erklärungen. So postulierten KENT et al. (1982), daß das wechselnde Verteilungsmuster der μ -Rezeptoren mit ihrer Lokalisation auf migrierenden Zellen zu begründen sei. UNNERSTALL et al. (1983) waren der Ansicht, daß eine Bewegung rezeptorbesetzter Zellkörper in Richtung etablierter Zellagen stattfände. LOUGHLIN et al. (1985) führten den Rückgang in der Rezeptorbindung auf eine erniedrigte Rezeptorsensitivität zurück, die durch die einsetzende Funktion der Synapsen in Gebieten mit hohen Opioidkonzentrationen sowohl in jugendlichen als auch in adulten Stadien bedingt sei.

Die genannten Autoren KENT et al. (1982), UNNERSTALL et al. (1983) und LOUGHLIN et al. (1985) interpretierten den festzustellenden Rückgang der μ -Bindungsstellen als aktuelle Rezeptorverluste.

Angesichts der neuronalen Entwicklungsvorgänge sind KORNBLUM et al. (1987a) jedoch der Auffassung, daß diese anscheinenden Verluste auf die Durchdringung solcher

Gebiete mit rezeptorarmen Dendriten und Gliazellen zurückzuführen ist.

Auf pharmakologischen Studien basierend wurde postuliert, daß [Met]- und [Leu]-Enkephalin die endogenen Liganden für die δ -Rezeptoren und Dynorphin A den Ligand für die k-Rezeptoren darstellten. Der endogene Ligand für die μ -Rezeptoren sei unbekannt (CHAVKIN et al., 1982). KORNBLUM et al. (1987a) bewiesen dagegen, daß es keine einfachen anatomischen Zugehörigkeiten von Rezeptortyp und Opioidsystem gibt.

Mit dieser Auffassung konform gehen auch LOUGHLIN et al. (1985), CHAVKIN et al. (1982), und CORBETT et al. (1982). Möglicherweise paßt also jeder Rezeptortyp in den verschiedenen Gehirnregionen funktionell zu verschiedenen Opioidpeptiden.

Obwohl bis heute schon viel über die Ontogenese der Opioidrezeptoren bekannt ist, hat man noch relativ wenig Erkenntnisse über deren Funktion. Die verschiedenen Untersuchungen haben jedoch deutliche Hinweise dafür erbracht, daß Opioidrezeptoren während der perinatalen Entwicklung in Funktion sind und die Fähigkeit besitzen, ontogenetische Prozesse wie Zellproliferation zu modulieren.

Verschiedene andere, für den Neonaten lebenswichtige Prozesse werden ebenfalls über die Opioidrezeptorfunktion kontrolliert. Dies sind z.B. der Saugvorgang (JACKSON und SEWELL, 1984) und die Mutter-Kind-Bindung (HERMAN und PANKSEPP, 1978).

TSANG und NG (1980) zeigten, daß Aktivierung der Opioidrezeptoren in frühen Lebensphasen, hervorgerufen durch exogene Agonisten, langfristige Veränderungen in der Rezeptoranzahl und -verteilung bewirken kann.

Aus den oben geschilderten Untersuchungsergebnissen kann der folgende Schluß gezogen werden. μ - und k-Rezeptoren erscheinen in bestimmten Gehirnregionen zu einem frühen Entwicklungszeitpunkt. δ -Rezeptoren treten erst später, und dann bereits in der adulten Verteilung zutage. Das frühe und z.T. vorübergehende Vorkommen von μ - und k-

Rezeptoren in einigen Gehirnbereichen könnte ein Hinweis auf ihre Rolle bei spezifischen ontogenetischen Funktionen sein.

2.5. Neuropharmakologische Beeinflußbarkeit der Opioid-rezeptorentwicklung im Gehirn von Nagetieren (Ratte und Maus) durch Opiate, Opioide und deren Antagonisten

Die sehr umfangreiche Literatur wurde ausführlich gesichtet und in Form einer tabellarischen Übersicht (Tabellen I bis V) zusammengefaßt. Es ergeben sich folgende Erkenntnisse:

1. Wirkungen von Morphin und Analoga

a) auf die Rezeptordichte

Die nicht einheitlichen Ergebnisse zeigen folgende Tendenz: Morphin bewirkte anfänglich eine Depression vor allem der μ -Rezeptoren, die sich aber im Laufe der Zeit nach dem Absetzen wieder ausglich. Es wurden nur Veränderungen in der Dichte der Rezeptoren festgestellt, die Affinität blieb immer konstant. Die Auswirkungen waren abhängig vom Alter der Versuchstiere, von der Dauer der Applikation und von der Gehirnregion.

b) auf die Entwicklung von Morphintoleranz

Die Morphintoleranz, das bedeutet die verminderte pharmakologische Wirksamkeit von einer einmaligen Morphingabe, war bis auf zwei Ausnahmen erhöht. Die Versuchstiere hatten ein gestiegenes Schmerzempfinden, und die Reaktionszeiten bei den Schmerzproben waren kürzer als bei den Kontrolltieren.

c) auf sonstige pharmakologische Parameter

Morphingaben in einer frühen Entwicklungsphase (p.c. oder p.n.) bewirkten eine erhöhte Mortalität in der 1. Woche p.n. und eine retardierte Entwicklung. Teratologische Veränderungen waren nicht feststellbar.

2. Wirkungen von Naloxone (NA) und Naltrexone (NX)

a) auf die Rezeptordichte

Chronische Naloxone- bzw. Naltrexonegaben bewirkten offensichtlich einen Anstieg der Rezeptordichte. In der Gruppe mit postnataler Applikation wurde ein genereller

Anstieg verzeichnet, während in der Gruppe der Adulten ein sehr starker (45%) Anstieg in der μ - und δ -Rezeptordichte und eine unveränderte k-Rezeptordichte beobachtet wurden.

b) auf die Entwicklung der Morphintoleranz

Die Morphintoleranz war bei NA- bzw. NX-Applikation vermindert. Dies hatte für die Tiere beim Tail-Flick-Test oder beim Hot-Plate-Test (Schmerzproben) eine größere Schmerzunempfindlichkeit zur Folge. Die verminderte Toleranz war bei den weiblichen Tieren größer als bei den männlichen.

c) auf sonstige pharmakologische Parameter

Naloxonegaben während der Gestations- oder der frühen Postnatalperiode hatten eine Entwicklungsbeschleunigung und eine Steigerung der Lernfähigkeit zur Folge. Das spontane und das sensomotorische Reaktionsvermögen war dosisabhängig gegenüber den Kontrollen zu steigern.

Zeichenerklärung:

Die in den nachstehenden Tabellen I bis V verwendeten Zeichen und Abkürzungen haben folgende Bedeutungen:

- | | |
|------------------|--|
| a) | - Rezeptordichte |
| b) | - Morphintoleranz |
| c) | - Besondere Effekte am ZNS und an anderen Organen |
| tgl. | - täglich |
| (xd) | - über x Tage hinweg |
| (*) | - Langzeitbehandlung |
| d.a.c. | - Tag vor der Konzeption |
| d.p.c. | - Gestationstag |
| d.p.n. | - Tag post natum |
| 1 (hochgestellt) | - untersucht mittels 3-H-markiertem Naloxone |
| 2 (hochgestellt) | - untersucht mittels 3-H-markiertem Morphin |
| 3 (hochgestellt) | - untersucht mittels Hot-Plate-Test (prüft das Schmerzempfinden mit Wärmereiz von einer heißen Platte) |
| 4 (hochgestellt) | - untersucht mittels Tail-Flick-Test (Schmerzprobe am Schwanz des Tieres) |
| ↑ bzw. ↓ | - Anstieg bzw. Rückgang |
| ↕ | - unverändert |
| n.u. | - nicht untersucht |
| > bzw. < | - größer bzw. kleiner |

Tabelle 1: Zusammenfassung der Befunde über die pharmakologischen Effekte von pränataler Morphingabe

WIRKSTOFF	DOSES	BEHANDLUNGS- ZEITRAUM	EFFEKTE	AUTOR
Morphin	20mg/kg	11.-21.d.p.c.	a) bis 30.d.p.n.: ↓ keine Veränderung am 60.d.p.n.: ↑ d. Rezeptoraffinität b) n.u.	KIRBY (1982)
I. Levorphanol II. Dextrorphan (analgesiein- aktives Iso- mer)	Zxtgl. 1,0mg/kg(3d), dann 75mg/kg(5d)	5.-12.d.p.c.	a) n.u. b) 5. Woche: $\uparrow$ I), $\uparrow$ (II) 9. Woche: $\uparrow$ (I)	O'CALLAGHAN und HOLTZMAN (1977)
Morphin (s. auch Tab. II)	1 Pellet à 75mg	16.d.p.c.	a) $\downarrow$ μ ($\uparrow$ Affinität) $\uparrow$ δ , κ b) $\uparrow$	TEMPEL et al. (1988)
Morphin	Zxtgl. 5,0mg/kg(3d) dann 10,0mg/kg(5d)	5.-12.d.p.c.	a) n.u. b) 3., 5., 11. Woche: $\uparrow$ c) Keine Unterschiede in der Blut- und in der Gehirnkonzentration zwischen behandelten Tieren und Kontrollen	O'CALLAGHAN und HOLTZMAN (1976)
Morphin (s. auch Tab. III)	Zxtgl. 10mg/kg	8.d.a.c. bis 1.d.p.n.	a) $\uparrow$, abhängig von Alter und Gehirnre- gion b) n.u.	TSANG und NG (1980)
Morphin	15-45mg/kg	5.-18.d.p.c.	a) n.u. b) n.u. c) Verhaltensaktivität: $\uparrow$ Mortalität in 1. Lebenswoche: $\uparrow$	DAVIS und LIM (1972)
Morphin	20mg/kg	I 2.-5.d.p.c. II 7.-9.d.p.c. III 11.-13.d.p.c. IV 17.-20.d.p.c.	a) n.u. b) $\uparrow$ (IV) 13.d.p.n.: $\uparrow$ 21.d.p.n.: $\uparrow$ c) (I-III) Keine teratologischen Befunde	JOHANNESSON und BECKER (1972)

Tabelle II: Zusammenfassung der Befunde über die pharmakologischen Effekte von postnataler Morphingabe

WIRKSTOFF	DOSIS	BEHANDLUNGS- ZEITRAUM	EFFEKTE	AUTOR
β -Endorphin (s.auch Tab.IV)	50ng/Tier	2.-7.d.p.n.	a)n.u. b) ⁴ 90.d.p.n.: ↓	SANDMAN et al. (1979)
β -Endorphin	I 1µg/Tier III 10µg/Tier III 50µg/Tier	1.-7.d.p.n.	a) 14.d.p.n.: ↓ b) ⁴ : ↑ c) Entwicklung retardiert	ZADINA et al. (1986)
Morphin	2mg/kg	21.p.n.	a)n.u. b) ³ : ↑	BARDO et al.(1981)
Morphin (s.auch Tab.IV)	5mg/kg	1.-21.d.p.n.	a)µ: ⁴ b) ³ 22.d.p.n.: ↑	BARDO et al.(1982)
Morphin	0,5-70mg/kg	I 20.d.p.n. II 26.d.p.n. III 32.d.p.n. IV 42.d.p.n. V Adult	a)n.u. b) ³ : ↑ (II)>(III)>(IV)>(V) c) Morphingehalt im Gehirn: (I)>(II)>(III)>(IV)>(V)	JOHANNESSON und BEOXER (1973)
β -Endorphin	50µg/kg	2.-7.d.p.n.	a)↓ in verschiedenen Gehirnregionen b) ⁴ : ↓	MOLDOW et al. (1981)
Morphin (s.auch Tab.I)	5mg/kg	0.-4.d.p.n. 0.-8.d.p.n. 0.-21.d.p.n. 0.-28.d.p.n	a)bis zum 8.d.p.n.: ↓ bis zum 14.d.p.n.: ↑ bis zum 28.d.p.n.: ↑ b)n.u.	TEMPEL et al. (1988)
Morphin	1 Pellet à 75mg	I 5.d.p.n. III 11.d.p.n.	a)n.u. b) ³ 48.d.p.n.: (I): ↑ (II): ↑ c) Körpergewicht: ↓	SONDREKGER et al. (1977)
Morphin	1µg/Tier	1.-7.d.p.n.	a) 6 Monate: ⁴ δ, ⁴ ↑ µ im Striatum u. Nuc. accumbens b)n.u.	HANDELMANN und QUI- RION (1983)
β -Endorphin	50µg/Tier	2.-7.d.p.n.	a)n.u. b) ⁴ 90.d.p.n.: ↓	SANDMAN et al. (1979)
Morphin	0,01mg/kg	5.-120.d.p.n.	a)bis 15.d.p.n.: ↑	AUGLY-VALETTE et al.
Phenylpiedrin	10mg/kg (25d) cum 20mg/kg (15d) cum 40mg/kg (75d)		b)bis 15.d.p.n.: ↑ bis 30.d.p.n.: ↓ ab 30.d.p.n.: ↑	(1978)

Tabelle III: Zusammenfassung der Befunde über die pharmakologischen Effekte von pränataler Maltrexone- bzw. Naloxonegabe:

WIRKSTOFF	DOSES	BEHANDLUNGS- ZEITRAUM	EFFEKTE	AUTOR
Maltrexone (s. auch Tab. IV)	I 1mg/ml (Trinkwasser)	0.-21.d.p.c.	a) n.u. b) ⁴ : ↑, männl. > weibl.	HARRY und ROSECRANS (1979)
Naloxone	I 20mg/kg II 40mg/kg	7.-20.d.p.c.	a) n.u. b) n.u. c) 3.-120.d.p.n.: Lernfähig- keit ↑ Entwicklung beschleunigt	VORHEES (1981)
Naloxone	I 100mg/ml II 30mg/ml (Mini-Pumpe)	Ia,IIa 17.-24.d.p.c. Ib,IIb 21.-28.d.p.c.	a) n.u. b) ³ : 40.d.p.n.: (IIa) ↓ c) (Ib): Mortalität ↑ (IIa): Körpergewicht ↓	HETTA und TEREIUS (1980)
Naloxone (s. auch Tab. I)	5 mg/kg (2xtgl.)	8.d.a.c. bis Geburt	a) ² : ↑, abhängig von Alter und Gehirnregion	TSANG und NG (1980)

Tabelle IV: Zusammenfassung der Befunde über die pharmakologischen Effekte von postnataler Naltrexone- bzw. Naloxonegabe

WIRKSTOFF	DOSIS	BEHANDLUNGS- ZEITRAUM	EFFEKTE	AUTOR
Naloxone	I 1mg/kg II 50mg/kg	1.-22.d.p.n.	a)n.u. b)n.u. c)Zunahme des spontanen und sensor- motorischen Reaktionsvermögens, (II) >> (I)	ZACON und MCLAUGHLIN (1985)
Naloxone (s.auch Tab.V)	I 0,5mg/kg oder II 1,5mg/kg oder III 5,0mg/kg oder IV 15,0mg/kg	1.-21.d.p.n.	a) ¹ : 21.d.p.n.: ↑ 28.d.p.n.: ↓ b)↓	BARDO et al. (1983)
Naloxone (s.auch Tab. II)	100µg/kg	2.-7.d.p.n.	a) Adult: ↓ im Hypothalamus b) ⁴ : ↓	MOLDOW et al. (1981)
Naloxone (s.auch Tab.II)	100µg/kg	I 2.-7.d.p.n. II Adult	a)n.u. b) ⁴ : (I) 90.d.p.n.: ↓ (II) 90.d.p.n.: ↓	SANDMAN et al. (1979)
Naltrexone (s.auch Tab.III)	1mg/ml (Trinkwasser)	1.-21.d.p.c und 1.-21.d.p.n.	a)n.u. b) ⁴ : ↓, männl.>weibl.	HARRY und ROSEGRANS (1979)
Naltrexone	I 20mg/kg II 60mg/kg	I 3.-14.d.p.n. II 15.-20.d.p.n.	a)n.u. b) ⁴ : 29.d.p.n.: ↓ ³ : 42.d.p.n.: ↓ c)Reflexe, Körpergewicht ↓	PAUL et al.(1978)
Naloxone (s.auch Tab.II)	I 1mg/kg 1xtgl. II 1mg/kg 2xtgl.	1.-21.d.p.n.	a)↑ b) ³ : 22.d.p.n.: ↓ c)Monoaminensystem ↓ Verhalten ↓	BARDO et al. (1982)
Naloxone (s.auch Tab.II)	100µg/Tier	2.-7.d.p.n.	a)n.u. b) ⁴ : 90.d.p.n.: ↓	SANDMAN et al. (1979)

Tabelle V: Zusammenfassung der Befunde über die pharmakologischen Effekte von Naltrexone- bzw. Naloxonagonen an adulte Versuchstiere

WIRKSTOFF	DOSES	BEHANDLUNGS- ZEITRAUM	EFFEKTE	AUTOR
Naltrexone	2 Pellets à 30mg	(8 d)	a)1.d.: μ, δ, κ : $\uparrow\uparrow$, Σ : $\downarrow$ ab 6.d.: μ, δ, Σ : $\downarrow$ b)n.u.	TEMPEL et al. (1982)
Naltrexone	1 μ l/h (Mini-Pumpe)	(7-8 d)	a) ² : $\uparrow$ in vielen Gehirn- regionen; aber $\downarrow$ in Subst.nigra, Striatum, Locus coeruleus b)n.u.	TEMPEL et al. (1984)
Naloxone (s.auch Tab.IV)	1mg/kg 2xtgl.	(21 d)	a) ¹ 1.d.: $\downarrow$ b)n.u.	BARDO et al. (1983)
Naltrexone	I 1 μ l/h (Mini-Pumpe) II 2 Pellets à 30mg/kg	I (7-8 d) II (*)	a)8.d.: μ, δ : $\uparrow\uparrow$, κ, Σ : $\downarrow$ 14.d.: $\downarrow$ b)8.d.: $\downarrow$ 14.d.: $\downarrow$	TEMPEL et al. (1984)
Naltrexone	Pellets à 30mg I 1 Pellet II 2 Pellets III 3 Pellets	Ia,IIa,IIIa (24 h) Ib,IIb,IIIb (8 d)	a)Ia bis IIIa: $\downarrow$ Ib bis IIIb: $\uparrow$ (45%) b)Ia bis IIIa: $\downarrow$ Ib bis IIIb: $\downarrow$ (50%) c)Korrelation von a und b	YOUNG et al. (1985)

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Versuchstiere

Die verwendeten Tiere waren Wistar-Ratten aus der Zucht der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung (GSF), München. Sie wurden in Einzelkäfigen in einem vollklimatisierten Tierstall bei einer konstanten Temperatur von 23°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 86% gehalten. Das Lichtprogramm sah künstliches Licht von 8.00 bis 18.00 Uhr vor. Die Ratten erhielten eine Standarddiät (Altromin), Wasser stand ihnen ad libitum zur Verfügung.

Zur Anpaarung wurden 10 Wochen alte Weibchen für die Dauer einer Nacht zu jeweils einem Männchen in den Käfig gesetzt. Am darauffolgenden Morgen wurde zur Kontrolle der Konzeption die Vagina auf Vorhandensein von Sperma untersucht. Dieser Tag wurde als Tag 0 post conceptionem (p.c.), der darauf folgende als Gestationstag 1 festgelegt.

Die 12 Muttertiere wurden in 4 Gruppen eingeteilt:

Gruppe I - keine Behandlung - **Kontrolle**

Gruppe II - keine Behandlung der Muttertiere, NX -
Applikation an die Jungtiere ab 1. Tag
p.n. 28 Tage lang - **Kontrolle + NX**

Gruppe III - ENU-Applikation an die Muttertiere am
14. Tag p. c., keine Behandlung der
Jungtiere - **ENU**

Gruppe IV - ENU-Applikation an die Muttertiere, NX -
Applikation an die Jungtiere
- **ENU + NX**

3.2. Behandlung mit ENU

Am 14. Gestationstag erfolgte die Behandlung der graviden Weibchen aus den Gruppen III und IV mit ENU.

Zu diesem Zweck wurde am Behandlungstag zwischen 9.00 und 11.00 Uhr 1-Ethyl-1-nitroso-urea (Sigma Chemie, München) in Citratpuffer pH 5,0 unter Zugabe von 0,2 ml Aceton gelöst und unmittelbar danach verwendet.

Die Konzentration der Lösung betrug 1 g/50 ml.

Den ungefähr 250 g schweren Muttertieren wurden 0,6 ml dieser Lösung intraperitoneal injiziert; dies entspricht 50 mg/kg Körpergewicht.

Unmittelbar nach der Geburt der Jungtiere wurden die Würfe innerhalb der jeweiligen Gruppen auf 10 Junge pro Muttertier ausgeglichen.

3.3. Behandlung mit Naltrexone (NX)

Vom 1. bis zum 28. Tag post natum erhielten die Jungen aus den Gruppen II und IV eine tägliche Naltrexone-Dosis von 50 mg/kg Körpergewicht durch subkutane Applikation in die Nackenfalte.

Naltrexone (Sigma Chemie, München) wurde in 3 unterschiedlichen Konzentrationen gelöst, welche je nach Alter bzw. Gewicht der Jungtiere zur Anwendung kamen. Dadurch konnte bei einer täglichen Einzeldosis vom 1. bis zu 28. Tag p.n. in Höhe von 50 mg/kg Körpergewicht das applizierte Einzelvolumen mit 0,05 bis 0,2 ml pro Tier relativ konstant gehalten werden. Die Behandlungen mit Naltrexone erfolgten jeweils zwischen 9.00 und 10.00 Uhr.

Am 28. Tag post natum wurden die Jungen von den Muttertieren abgesetzt und nach Geschlechtern getrennt.

3.4. Sektionen

Zu den jeweiligen Sektionsterminen wurden aus jeder Versuchsgruppe nach Möglichkeit gleich viele männliche und weibliche Tiere entnommen, getötet und seziiert (Alter und Anzahl der Tiere s. Tab. 1).

Vor der Tötung war bei allen Tieren das Körpergewicht bestimmt worden.

3.4.1. Applikation von 3-H-Thymidin

Jeweils ein Männchen und ein Weibchen pro Gruppe erhielten 60 Minuten vor der Tötung eine einmalige, intraperitoneal verabreichte Dosis von $5 \mu \text{ Ci/g}$ Körpergewicht Methyl-3-H-Thymidin (spezifische Aktivität 50-80 Ci/mmol, New England Nuclear, Dreieich).

Zur Tötung wurden die Tiere in ein Gefäß mit Äther gesetzt.

Nach Entnahme von Gehirn, Thymus und Milz wurden die Organe gewogen und zur Fixierung in 8%iges Formalin eingelegt.

3.5. Herstellung der histologischen Präparate und Befunderhebung

Nach 10-tägiger Fixierung wurde aus jedem Gehirn in Querrichtung der Vorderhirnbereich zwischen Bregma +0,50mm und Bregma -0,80mm (nach PAXINOS und WATSON, 1986) in Form mehrerer Scheiben entnommen und in Paraplast eingebettet.

Das eingebettete Material wurde bei einer Schnittstärke von $6 \mu \text{m}$ in Serie geschnitten.

Die Schnitte, die von nicht mit 3-H-Thymidin behandelten Tieren stammten, wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

Sie wurden lichtmikroskopisch auf pathologische Veränderungen untersucht. Bei den mit ENU und bei den mit ENU + NX behandelten Tieren wurden die Häufigkeiten (in

Prozent der untersuchten Tierzahl) auftretender Präneoplasien und Gliome bestimmt. Weiterhin wurde die Mitoserate der Zellen aus der subependymalen Schicht ermittelt.

Die Zählung wurde bei 630-facher Vergrößerung an jeweils 8-10 histologischen Schnitten durchgeführt und umfaßte die lateralen und dorsolateralen Regionen der SEZ der großen Ventrikel I und II.

Aus den Ergebnissen wurde der Mittelwert $\pm$ Standardfehler berechnet.

3.6. Entwicklung, Fixierung und Auswertung der Autoradiographien

Die histologischen Schnitte der Gehirne von mit 3-H-Thyminidin behandelten Tieren wurden zunächst entparaffiniert. Anschließend wurden sie in Kodak-NTB-2-Emulsion getaucht und für die Dauer von 3 Wochen bei 4°C im Dunkeln exponiert. Daran schloß sich die Entwicklung der Autoradiographien in Kodak-D-19-Entwickler und die Fixierung mit Kodak "Unifix" an.

Nach dem Trocknen erfolgte die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin.

Zur Auswertung unter dem Lichtmikroskop bei 400-facher Vergrößerung wurde zuerst die Gesamtzellzahl der Subependymzone (SEZ) jedes Ventrikels ermittelt. Diese Gesamtzellzahl wurde in Relation zur Zahl der gezählten markierten Zellen gesetzt, daraus resultierte der Markierungsindex.

Es wurden diejenigen Zellen als markiert gezählt, deren Kerne mindestens 5 Silberkörnchen enthielten.

Von jeder Versuchsgruppe und darin wiederum von jeder Altersstufe wurde das arithmetische Mittel der Markierungsindizes und der Standardfehler ermittelt.

Die photographische Dokumentation erfolgte mit dem Leitz-Wild M 400- bzw. dem Zeiss-Photomikroskop.

3.7. Darstellung der Ergebnisse

Die am Sektionstag bestimmten Körpergewichte wurden in zwei Tabellen (Tab.2 und 3) zusammengefaßt. Die einzelnen Organgewichte (Gehirn, Thymus, Milz) wurden zum jeweiligen Gesamtkörpergewicht in Relation gesetzt, und die sich so ergebenden Prozentwerte in Tabellenform (Tab.6-11) sowie in Form von Säulendiagrammen (Abb. 17-22) dokumentiert.

Die Mitoserate, das heißt der Anteil der sich in Teilung befindlichen Zellen an der Gesamtzellzahl der SEZ, wurde, wie auch der Markierungsindex der Autoradiographien, in Form einer Tabelle (Tab. 12 und 13) dargestellt.

Bei den Ratten der Gruppen III und IV (ENU- und ENU + NX-Behandlung) wurden die Prozentzahlen der Tiere, bei denen sich Präneoplasien und Gliome entwickelt hatten, ermittelt, und diese Ergebnisse tabellarisch zusammengefaßt (Tab. 14) sowie in einem Säulendiagramm (Abb. 16) aufgezeichnet.

4. ERGEBNISSE

4.1. Kontrollen

4.1.1. Körpergewichts- und Organgewichtsentwicklung

Die größte Steigerungsrate von über 150% zeigten die Körpergewichte zwischen der 4. und 6. Woche. Anschließend verlief die Gewichtszunahme bis zur 12. Woche kontinuierlich.

Das höchste Gehirngewicht wurde mit 2,01 g bei den männlichen Tieren in der 10. Woche verzeichnet. Die Gehirn/Körpergewichts-Relation, d.h. der Anteil des Gehirns am Gesamtkörpergewicht war im Alter von 4 Wochen mit Abstand am höchsten und sank dann bis zur 12. Woche gleichförmig auf die Werte $0,76 \pm 0,05\%$ bei den männlichen und $1,0 \pm 0,06\%$ bei den weiblichen Tieren ab.

Der Anteil des Thymusgewichts am Körpergewicht lag in der 4. Woche bei den männlichen Tieren bei 0,45% und bei den weiblichen Tieren bei 0,49%. Diese sogenannten Thymusindizes nahmen im Laufe der Entwicklung kontinuierlich bis auf 0,15% (männliche Tiere) und 0,21% (weibliche Tiere) ab.

Auch die sogenannten Milzindizes zeigten einen regressiven Entwicklungsverlauf, der jedoch gegenüber den Thymuswerten wesentlich langsamer war (z.B. bei den männlichen Tieren von 0,41% mit 4 Wochen auf 0,25% mit 12 Wochen).

4.1.2. Histologische Befunde

Die histologischen Befunde der mit Haematoxylin-Eosin gefärbten Schnitte des frontalen Vorderhirns stammen von der dorsalen und der lateralen Wand der Seitenventrikel. Die dem Ventrikellumen zugewandte Oberfläche, die meist aus einer Zelllage besteht, wird als Ependymzone (EZ), die darunter liegende mehrlagige Schicht als Subependymzone (SEZ) bezeichnet.

Bei den Tieren im Alter von 4 Wochen war keine deutliche Abgrenzung der EZ von der SEZ festzustellen. Das meist identische färberische Verhalten der Zellen beider Zonen ließ eine eindeutige Zuordnung zu EZ oder SEZ nicht zu. Nur kleine, polygonal geformte Zellen mit dunklem Zellkern waren eindeutig der SEZ zuzuordnen, da sie in keinem Fall an der Oberflächengestaltung des Ventrikellumens teilnahmen (s. Abb. 1).

Im Alter von 6 Wochen konnte zwischen EZ und SEZ deutlich unterschieden werden. Außer dem geringeren Durchmesser beider Zonen gab es jedoch im Vergleich zu den vierwöchigen Kontrolltieren keine wesentlichen Unterschiede.

Auch bei den 8-12 Wochen alten Kontrolltieren unterschied sich der histologische Aufbau von EZ und SEZ nicht von dem der jüngeren Kontrolltiere.

Bemerkenswert war lediglich die fortschreitende Abnahme des Durchmessers beider Zonen sowie eine leichte Abnahme der Zellzahl in der SEZ.

4.1.3. Mitoserate

Bei 4 Wochen alten Tieren betrug die Mitoserate $1,72 \pm 0,17\%$, bei 6 Wochen alten Tieren $0,65 \pm 0,10\%$. Bis zum Alter von 16 Wochen erfolgte ein gleichförmiger Rückgang auf $0,10 \pm 0,03\%$. Diese Werte wurden auch noch mit 24 Wochen gefunden.

4.1.4. Markierungshäufigkeit

Der Anteil der autoradiographisch markierten Zellen an allen SEZ-Zellen nahm von der 4. Woche bis zur 12. Woche permanent ab. Ein Rückgang von ca. 20% wurde von der 4. Woche ($18,80 \pm 0,52\%$) auf die 6. Woche ($15,17 \pm 5,33\%$) verzeichnet.

Danach sanken die Werte erst um ca. 1%, dann wieder um ca. 20% und von der 10. auf die 12. Woche um 15% auf die Markierungshäufigkeit von $9,45 \pm 1,66\%$.

4.2. Naltrexone-behandelte Tiere

4.2.1. Körpergewichts- und Organgewichtsentwicklung

Bis zur 10. Woche lagen die Körpergewichtswerte unterhalb der Kontrolltiere, danach glichen sie sich fast vollständig an diese an. Die absoluten Gehirngewichte waren fast durchgängig niedriger als die der unbehandelten Tiere, bei den Gehirn/Körpergewichts-Relationen war im Vergleich zu den Kontrollen keine deutliche Diskrepanz feststellbar. Es wurden zum Teil sogar erheblich höhere Gehirnindexwerte beobachtet, so z.B. in der 6. Woche.

Bei den Thymus/Körpergewichtsrelationen, den sogenannten Thymusindizes, und bei den Milz/Körpergewichts-Relationen (Milzindizes) wurden im Alter von 4 Wochen die höchsten Werte aller 4 Gruppen registriert. Im Alter von 12 Wochen war sowohl der Thymus- als auch der Milz-Index deutlich abgesunken. Die Thymus/Körpergewichts-Relation war jedoch mit 0,17% bei den Männchen und 0,24% bei den Weibchen die höchste der 4 Behandlungsgruppen.

4.2.2. Histologische Befunde

Die bei den nicht mit Naltrexone (NX) behandelten vierwöchigen Kontrolltieren beschriebenen Befunde gelten im wesentlichen auch für die NX-behandelten Tiere.

Im Gegensatz zu den unbehandelten Kontrollen war jedoch die lockere Strukturierung des Gewebes auffällig, die ihren besonders deutlichen Ausdruck in der zystischen Auflockerung der subventrikulären Region fand (s. Abb. 2). Auch ein stärkeres Auseinanderweichen der SEZ-Zellen war zu beobachten.

Zusammen mit der prallen Füllung der Gefäße sind diese Befunde Ausdruck einer stärkeren Gewebedurchblutung.

Bei den 6-12 Wochen alten Tieren waren gleichartige Befunde festzustellen. Während jedoch bei den 4- bis 10wöchigen Tieren, ebenso wie bei jeder Altersstufe der

unbehandelten Kontrollen, die Ependymzellen eine eher abgeflachte Gestalt hatten, so zeigten die der 12 Wochen alten NX-behandelten Tiere eine deutlich kubische Form.

4.2.3. Mitoserate

Die Mitoserate war in jeder Altersgruppe deutlich höher als bei den Kontrollen. Von der 4. ($2,20 \pm 0,20\%$) bis zur 8. Woche ($3,77 \pm 0,31\%$) stieg sie an und hatte damit etwa den 9-fachen Wert der gleichaltrigen unbehandelten Tiere.

Zwischen der 8. und der 10. Woche kam es zu einer starken Abnahme der Mitoserate auf $1,03 \pm 0,15\%$, die sich bis zur 12. Woche in abgeschwächter Form auf $0,55 \pm 0,12\%$ fortsetzte.

4.2.4. Markierungshäufigkeit

Der Anteil der markierten Zellen der SEZ zeigte ein relativ konstant hohes Niveau.

Von $18,55 \pm 1,71\%$ mit 4 Wochen als dem niedrigsten Wert wurde ein rascher Anstieg auf den Höchstwert von $24,91 \pm 5,30\%$ im Alter von 6 Wochen verzeichnet. Danach pendelten sich die Werte um $20,0\%$ ein, mit 10 Wochen wurden noch einmal $23,69 \pm 4,27\%$ erreicht..

4.3. ENU-behandelte Tiere

4.3.1. Körpergewichts- und Organgewichtsentwicklung

Obwohl die Entwicklung des Körpergewichts eine kontinuierliche Aufwärtstendenz mit denselben Merkmalen wie bei den Kontrolltieren zeigte, waren die Gewichte jedoch deutlich niedriger.

Vor allem in der 6. Woche war diese Diskrepanz mit um 35% niedrigeren Werten gegenüber den Kontrollen herausragend erkennbar.

Nach diesem Zeitpunkt glichen sich die Körpergewichte der beiden Versuchsgruppen allmählich wieder an. Die Gehirngewichte, die anfangs auch unter denen der Kontrollen lagen, bestätigten die ab der 6. Woche beginnende Kompensationstendenz.

Die relativ niedrigen Gehirn/Körpergewichts-Relationen zeigten, daß die Gehirngewichte in dieser Gruppe im Vergleich zum Körpergewicht während des gesamten Versuchszeitraums besonders gering waren.

Die prozentualen Anteile der Thymus- und Milzgewichte am Körpergewicht unterschieden sich nicht signifikant von denen der unbehandelten Kontrolltiere.

4.3.2. Histologische Befunde

Im Alter von 4 Wochen war eine markante Trennung zwischen EZ und SEZ erkennbar (s. Abb. 3).

Die Ependymzellen hatten kubische Gestalt, ihre Verbindungen untereinander schienen zum Teil unterbrochen. Die in den unbehandelten Kontrollen in der SEZ vorhandenen kleinen, polygonal geformten Zellen mit dunklem Kern traten zahlenmäßig in den Hintergrund, waren aber bei ihrem Auftreten zu kleinen Gruppen zusammengelagert.

Bei den 6 Wochen alten Tieren war die EZ deutlich ausgebildet, die SEZ grenzte unmittelbar und ohne Lückenbildung an. Die Struktur der EZ war im Gegensatz zu den Kontrollen aufgelockert und wabig-blasig. An Stellen durchbrochener EZ (s. Abb. 4), erkenntlich auch am Austritt von Detritus, war auffallend, daß die EZ nahezu ausschließlich mit großen, den Ependymzellen ähnelnden SEZ-Zellen mit hellem Kern in Kontakt stand. In diesem Bereich des Übergangs von der EZ zur SEZ waren nur wenige kleine Zellnester aus kleinen, polygonalen Zellen mit dunklem Kern zu erkennen. Die überwiegende Anzahl dieser Zellnester lag im distalen Teil der SEZ bzw. in der etwas ödematös aufgelockerten Parenchymgrenzzone.

Ab der 8. Woche beginnend und bis zur 12. Woche zunehmend erschien die EZ von der SEZ abgehoben.

An Stellen eines EZ-Aufbruchs (s. Abb. 5) senkten sich die EZ-Zellen anscheinend in Richtung auf die SEZ ab. Die Migrationstendenz dieser EZ-Zellen war eindeutig auf die als prägliomatös anzusprechenden, intraparenchymal gelegenen Gebilde hin gerichtet, die in Abb. 5 sichtbar sind.

Zum Teil scheinen diese Zellen Anschluß an die neoplastischen Strukturen gefunden zu haben.

Im Trennungsbereich zwischen EZ und SEZ sowie in der SEZ waren vakuolenartige Strukturen erkennbar.

Im Alter von 12 Wochen war die SEZ relativ schmal, sehr deutlich von der darüberliegenden EZ abgehoben und bestand nahezu ausschließlich aus großen Zellen mit hellem Kern.

Zwischen SEZ und Parenchym war ab der 8. Woche und insbesondere in der 12. Woche keine sichtbare Abgrenzung mehr vorhanden.

Dies betraf vor allem die Fälle, wo sich distal der SEZ intraparenchymal gelegene Mikrotumoren entwickelt hatten.

Bei den im Alter von 6 Wochen erstmals beobachteten präneoplastischen Veränderungen bzw. gliomatösen Herden im Bereich der SEZ gab es folgende Befunde. Bei den 6 Wochen alten Tieren traten keine manifesten Gliome, aber bei 10% der Ratten sogenannte Präneoplasien, das sind die frühesten erkennbaren tumorösen Gewebeläsionen, auf. Unter Präneoplasien sind Läsionsareale mit auffällig höherer Dichte an Gliazellen, die z.T. in geringgradig aufgelockerter Gewebestruktur eingebettet sind, zu verstehen. Teilweise war die lockere Ansammlung solcher Gliazellen nur durch die autoradiographische Auswertung als Präneoplasie zu definieren.

Nach 8 Wochen fanden sich bei 10% der Tiere bereits Veränderungen, die als gliomatöse Herde anzusprechen sind; präneoplastische Veränderungen wurden nicht registriert. Die auffälligste Beobachtung stellt in diesem Alter die Diskrepanz bei den Häufigkeiten der gliomatösen Herde zwischen alleiniger ENU-Behandlung (10%) und

ENU + NX-Behandlung (38,9%) dar. Im weiteren Verlauf der Entwicklung stiegen die Gliomfrequenzen kontinuierlich an, wohingegen die Präneoplasien mit 10%-iger Häufigkeit beobachtet wurden. Im Alter von 24 Wochen wurde eine Gliomrate von 90% registriert. Bei der summarischen Zusammenfassung der Häufigkeiten von Präneoplasien (A) und Gliomen (B) (s.Tab.14) über alle Altersstufen hinweg ergaben sich Werte von 7,0% bei den präneoplastischen Veränderungen und 19,7% bei den Gliomen, was einer Gesamtrate von 26,7% entspricht. Die Summenwerte unterschieden sich nicht signifikant von denen nach ENU + NX-Behandlung. Einzig in der 8. Woche war zwischen den beiden Versuchsgruppen III und IV eine markante Differenz der Summenwerte festzustellen.

4.3.3. Mitoserate

Die höchste Mitoserate nach alleiniger ENU-Behandlung war im Alter von 6 Wochen mit $2,62 \pm 0,30\%$ zu verzeichnen.

Zwischen der 6. und 8. Woche fiel sie stark ab auf einen Wert von $1,50 \pm 0,26\%$, um anschließend weiter bis zum Alter von 10 Wochen ebenso stark auf $0,77 \pm 0,34\%$ abzusinken.

In der 12. Woche wurde wieder ein leichter Anstieg auf $0,95 \pm 0,30\%$ verzeichnet. Bis zum Alter von 24 Wochen erniedrigten sich die Werte bis auf $0,66 \pm 0,19\%$.

In den ab der 8. Woche erstmals auftretenden Gliomherden wurde in der 8. Woche der Höchstwert von $3,05 \pm 0,28\%$ registriert. Bis zur 12. Woche fiel die Mitoserate innerhalb dieser Herde auf $0,76 \pm 0,26\%$ ab.

4.3.4. Markierungshäufigkeit

Der Prozentsatz der markierten SEZ-Zellen zeigte nach ENU-Behandlung mit zunehmendem Alter keine kontinuierliche Entwicklung.

Der niedrigste Wert wurde in der 6. Woche mit $8,55 \pm$

3,74%, der höchste nach 10 Wochen mit $16,83 \pm 4,99\%$ beobachtet. Der Anstieg von der 6. Woche zur 8. Woche verlief relativ steil um ca. 40% auf $12,29 \pm 2,36\%$. Danach gab es ein Anwachsen auf den Höchstwert von $16,83 \pm 3,99\%$, was einem ca. 36%igen Anstieg entspricht, und schließlich eine geringfügige Abnahme auf $16,33 \pm 3,04\%$ in der 12. Woche. In einem Fall konnte auch das Auftreten eines Glioms an der Capsula externa autoradiographisch beobachtet werden (vgl. Abb. 16 mit Abb. 7). Das Ausmaß der autoradiographischen Markierung der SEZ eines 6 Wochen alten Tieres gibt Abb. 14 wieder. Vgl. hierzu Abb. 15 (ENU + NX, 6 Wochen).

4.4. ENU + Naltrexone-behandelte Tiere

4.4.1. Körpergewichts- und Organgewichtsentwicklung

Die Körpergewichte waren zum Teil deutlich höher als bei den nur ENU-behandelten Tieren und etwa gleich hoch wie bei den unbehandelten Kontrollen. Mit 12 Wochen lagen die Gewichte auf dem selben Niveau wie bei den 3 anderen Gruppen.

Bis zur 10. Woche waren die Gehirngewichte höher als bei der ENU-Gruppe ohne NX-Behandlung. Die Gehirnindexwerte lagen auch leicht über denen jener Tiere. Die Gehirngewichtszunahme verlief insgesamt gedämpfter als bei den unbehandelten Kontrollen. Die Endwerte von 1,60 g bei den männlichen und 1,56 g bei den weiblichen Tieren waren die niedrigsten aller Versuchstiere.

Auch die Gehirn/Körpergewichts-Relationen spiegeln dies wider.

Während die Milzindizes sich nicht von den übrigen Versuchsgruppen unterschieden, fielen im Fall des Thymus niedrigere Gewichtsanteile bei den 4-6 Wochen alten Tieren auf (0,33%-0,35% bei den Männchen). Zum Alter von 12 Wochen hin glichen sich die Thymusgewichtsanteile jedoch wieder an die Werte der anderen Gruppen an.

4.4.2. Histologische Befunde

Bei den 4 Wochen alten Tieren fiel auf, daß im lateralen Ventrikelbereich der Durchmesser von EZ und SEZ größer war als bei Tieren mit alleiniger ENU-Behandlung. Gleichzeitig war auch ein größerer Zellreichtum sowie eine größere Zelldichte zu verzeichnen.

Im Gegensatz zur dorsalen Region des Ventrikels, wo eine sehr gute Trennung zwischen EZ und SEZ zu beobachten war, erschien im lateralen Bereich die EZ nicht von der SEZ abgrenzbar (s. Abb. 8). Zum Gehirnparenchym hin setzte sich die SEZ hingegen deutlich ab.

Die in der SEZ vorhandenen kleinen, polygonalen Zellen mit dunklem Kern waren völlig unregelmäßig zwischen den großen Zellen mit hellem Kern eingelagert und zeigten nur selten die Tendenz zur Bildung kleinerer Gruppen. In den dorsalen Gebieten kamen diese kleinen Zellen lediglich in geringer Anzahl vor.

Im Alter von 6 Wochen war der Durchmesser von EZ und SEZ vergleichbar mit dem bei alleiniger ENU-Behandlung.

Die EZ war deutlich ausgebildet und auch gut von der SEZ zu unterscheiden. Auffallend war, daß die kleinen, polygonal geformten Zellen in Zellhäufchen von 2-5 Zellen zusammengelagert waren, direkt subependymal lagen und in engem Kontakt zu den Ependymzellen standen.

Daneben fiel auf, daß in Bereichen von Zusammenhangstrennungen der EZ eine deutliche Unregelmäßigkeit im schichtweisen Aufbau von EZ und SEZ zustande gekommen war (s. Abb. 9): Zellen, die von der EZ abstammen dürften, senkten sich in die Tiefe der SEZ hinein, wobei im H.E.-gefärbten Schnitt keine Unterscheidungsmerkmale zwischen Zellen der EZ und denen der SEZ feststellbar waren.

Es bestand teilweise eine sehr unregelmäßige Zellvermischung, an der als einzig konstantes Merkmal in keinem Fall die kleinen, polygonalen Zellen mit dunklem Kern beteiligt waren.

Der Durchmesser von EZ und SEZ war nach 8 Wochen bedeu-

tend größer als bei gleichaltrigen, nur mit ENU behandelten Tieren. Zu diesem Zeitpunkt war die EZ zwar deutlich ausgeprägt, die Abgrenzung zur SEZ jedoch nur schwer möglich. Dies galt insbesondere für Abschnitte, in denen die SEZ ausschließlich aus großen Zellen mit hellem Kern bestand, die sich nicht deutlich von den ependymalen Zellen unterschieden (s. Abb. 10). In den anderen Abschnitten hingegen stellten kleine Gruppen von kleinen, polygonalen Zellen mit dunklem Kern eine deutliche Demarkationslinie zwischen SEZ und EZ dar.

Die im Alter von 8 Wochen erstmals auftretenden, nur histologisch wahrnehmbaren Gliome waren durchwegs Oligodendrogliome mit einer auffallenden anaplastischen Tendenz.

Mit 10-12 Wochen war die EZ gut von der SEZ zu unterscheiden, besonders aufgrund der flach-kubischen Form der Ependymzellen.

An die Ependymzellen grenzten die SEZ-Zellen unmittelbar an, nur stellenweise von einem schmalen subependymalen Spalt getrennt. Die SEZ, soweit überhaupt gegenüber dem darunterliegenden Parenchym abgegrenzt, war relativ zellreich, wobei hauptsächlich nahezu runde Zellen mit deutlich anfärbbarem Karyoplasma (oligodendrogliähnliche Zellen) zu erkennen waren.

Gliomatöse Foci traten an den Stellen auf, wo ein direkter, kontinuierlicher Zusammenhang zwischen EZ, SEZ und intraparenchymalen Ansammlungen von Gliomzellen zu beobachten war (s. Abb. 11).

Beim Auftreten solcher gliomatöser Herde im Parenchym war der Übergang von der SEZ zu diesen tumorösen Gebilden fließend und ohne klare Begrenzung. Häufig durchsetzten solche Strukturen die gesamte SEZ und imponierten durch ein stark anaplastisches Aussehen. (s. Abb. 12).

Bei den Häufigkeiten der Präneoplasien und Gliome wurden im Alter von 6 Wochen die selben Ergebnisse wie bei der ENU-Gruppe erzielt (Präneoplasien 10%, Gliome 0%). Mit 8 Wochen ergab sich die schon oben erwähnte auffällige

Diskrepanz zwischen Präneoplasien und Gliomen nach ENU-Behandlung einerseits und Präneoplasien und Gliomen nach ENU + NX-Behandlung andererseits (ENU 10%, ENU + NX 38,9%). Im Lauf der weiteren Entwicklung wurden bei den präneoplastischen Herden Häufigkeiten von um 10% beobachtet, während die Gliominzidenz von 20% in der 10. und 12. Woche auf 80% in der 24. Woche anstieg. Die Totalwerte aller Alterstufen lagen bei 9,4% (Präneoplasien) und 22,3% (Gliome). Sie unterschieden sich damit nicht in signifikanter Weise von denen nach ENU-Behandlung. Die durchschnittliche Größe der Tumoren im Alter von 6 Monaten wird durch die Abb. 13 illustriert. In diesem Fall war der anaplastische Charakter bereits bei kleinerer Vergrößerung deutlich zu erkennen.

4.4.3. Mitoserate

Die Mitoserate der mit ENU und NX-behandelten Tiere zeigte ein relativ konstantes Niveau. Schwankungen waren weniger ausgeprägt als bei ENU alleine.

Im Mittel ergaben sich jedoch deutlich höhere Werte.

Die höchste Mitoserate wurde im Alter von 4 Wochen mit $2,63 \pm 0,27\%$ beobachtet. Bis zur 6. Woche war sie leicht auf $2,12 \pm 0,42\%$ abgefallen, um dann wieder anzusteigen auf den zweithöchsten Wert ($2,35 \pm 0,31\%$). Nach einem geringen Rückgang bis zur 10. Woche erfolgte darauf wieder ein Ansteigen bis zur 12. Woche. In jeder Altersstufe lag die Mitoserate über 2,0%.

In den gliomatösen Bezirken waren, wie auch bei alleiniger ENU-Behandlung, die Werte durchwegs höher als zum selben Zeitpunkt in den nicht gliomatösen Gebieten. So wurde mit 8 Wochen in solchen tumorösen Gebilden eine Mitoserate von $3,82 \pm 0,35\%$ festgestellt. Die Werte sanken dann mit steigendem Alter auf $1,35 \pm 0,40\%$ bei 12 Wochen alten Tieren.

4.4.4. Markierungshäufigkeit

Die markierten Zellen machten nach ENU- und NX-Behandlung einen höheren Anteil an der Gesamtzellzahl der SEZ aus als bei alleiniger ENU-Behandlung.

Nach einem Wert von $16,16 \pm 4,70\%$ im Alter von 4 Wochen stieg die Häufigkeit auf $21,44 \pm 3,31\%$ mit 8 Wochen an, was im Vergleich zu den gleichaltrigen ENU-, aber nicht NX-behandelten Tieren eine Zunahme um 150% bedeutet. Bis zur 8. Woche ging die Markierungshäufigkeit noch einmal stark zurück auf $9,65 \pm 1,25\%$. Danach stieg sie jedoch wieder auf $22,57 \pm 3,54\%$ im Alter von 12 Wochen an.

Abb. 15 illustriert die Markierungshäufigkeit eines 6 Wochen alten Tieres (vgl. hiermit Abb. 14).

4.5. Anhang: Abbildungen, graphische Darstellungen und Tabellen

4.5.1. Abbildungen

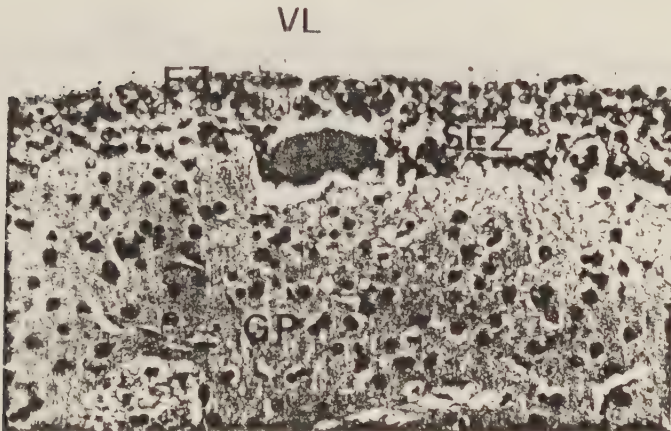


Abb.1: Kontrolltier, 4 Wochen. Ausschnitt aus der lateralen Wand der Seitenventrikel des Großhirns. Ependymzone (EZ) und darunter Subependymzone (SEZ), bestehend aus großen Zellen mit hellem Kern sowie kleinen, polygonalen Zellen mit dunklem Kern. H.E., 560 x

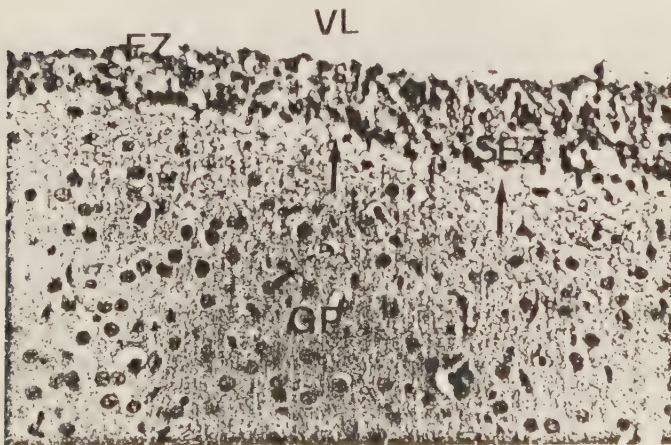


Abb.2: Kontrolltier mit NX-Behandlung, 4 Wochen. (Ausschnitt wie Abb.1). Lockere Strukturierung von EZ und SEZ mit zystisch-ödematöser Grenzzone (Pfeile) zwischen SEZ und Gehirnparenchym. H.E., 560 x

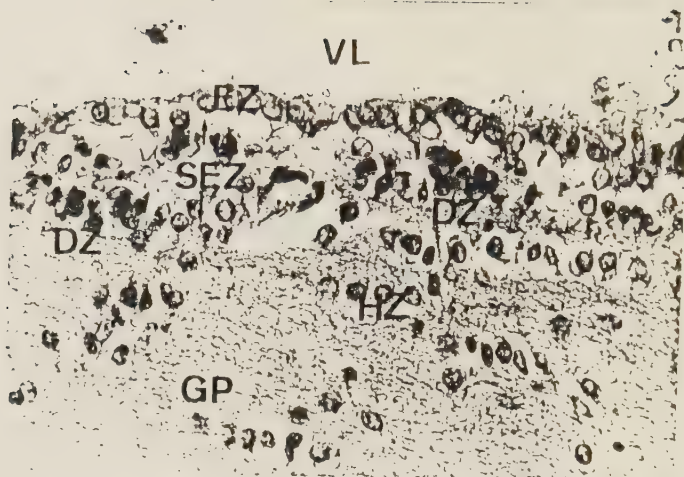


Abb.3: ENU, 4 Wochen. Gute Abgrenzung zwischen EZ und SEZ; Gruppenbildung der kleinen, polygonalen Zellen (DZ). H.E., 875 x

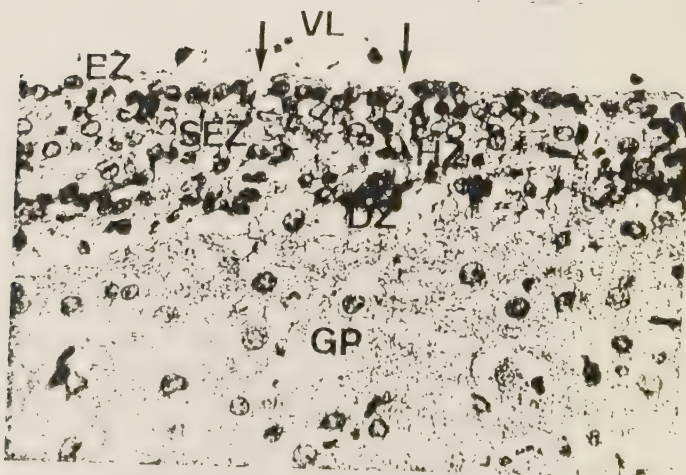


Abb.4: ENU, 4 Wochen. Kontinuität der EZ an mehreren Stellen unterbrochen (Pfeile); Austritt von Detritus ins Ventrikellumen; am Übergang EZ-SEZ nur große Zellen mit hellem Kern (HZ); die kleinen, polygonalen Zellen (DZ) sind nur distal zu finden. H.E., 875 x

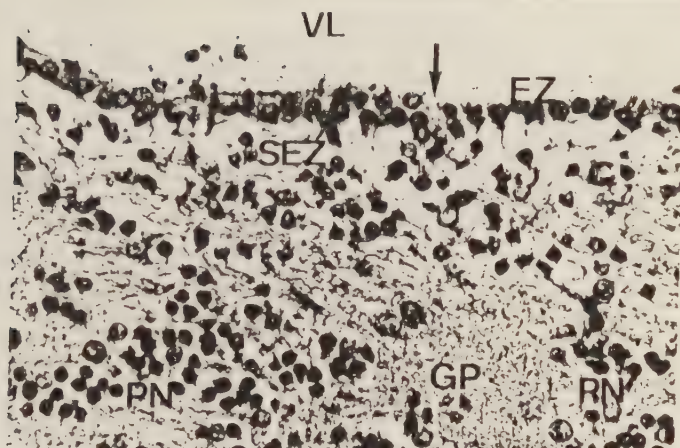


Abb.5: ENU, 12 Wochen. Gute Unterscheidung zwischen EZ und SEZ. EZ-Zellen senken sich an einer EZ-Bruchstelle (Pfeil) in die SEZ in Richtung auf die präneoplastische Veränderung (PN) ab. H.E., 875 x



Abb.6: ENU, 6 Wochen. Ausschnitt einer Histoautoradiographie im Bereich der Capsula externa. Die erhöhte Markierungshäufigkeit dieser zell dichteren Region (Pfeile) ist symptomatisch für eine präneoplastische Läsion. H.E., 350 x

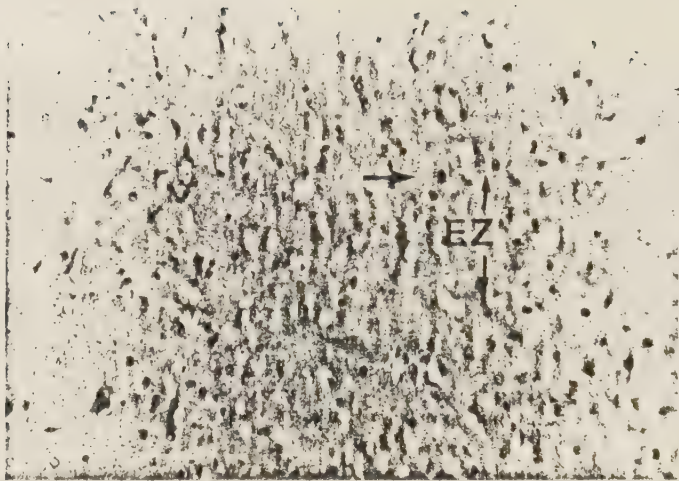


Abb.7: ENU, 6 Wochen. Verhältnisse bei dem selben Tier wie bei Abb.6 auf der kontralateralen Seite ohne pathologische Veränderung. Vgl. die deutlich geringere Markierungshäufigkeit dieser Region (Pfeil). H.E., 350 x

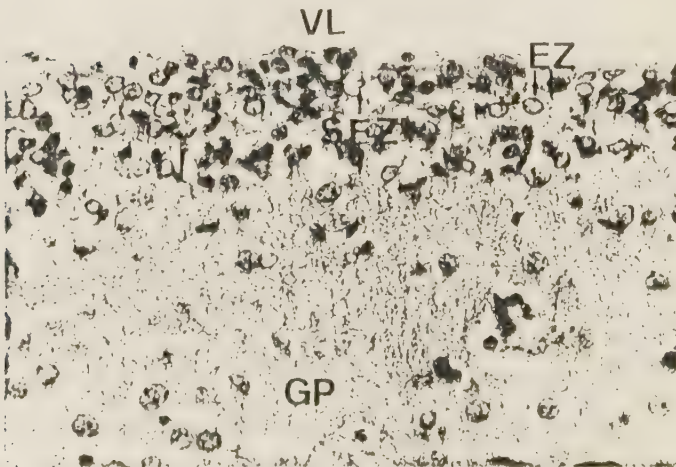


Abb.8: ENU + NX, 4 Wochen. Keine Abgrenzung zwischen EZ und SEZ; Verbreiterung des Durchmessers beider Zonen; geringere Anzahl der kleinen polygonalen Zellen. H.E., 875 x

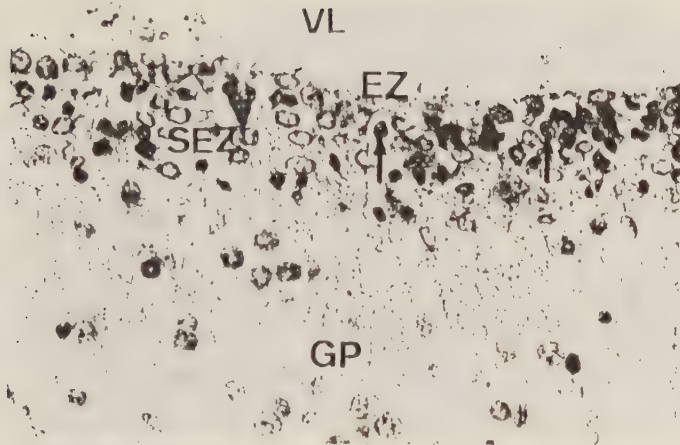


Abb.9: ENU + NX, 6 Wochen. Kaum Trennung zwischen EZ und SEZ. EZ-Zellen (Pfeile) sind Übergangslos auch in der SEZ zu finden. H.E., 875 x

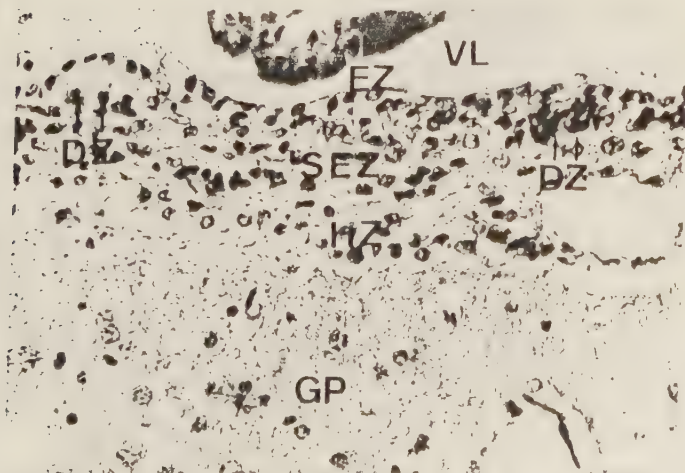


Abb.10: ENU + NX, 8 Wochen. Deutlich verbreiterte SEZ, die fast ausschließlich aus großen Zellen mit hellem Kern besteht; eine Abgrenzung zur EZ ist nur schwer möglich. Einige wenige polygonale Zellen mit dunklem Kern (DZ). H.E., 560 x

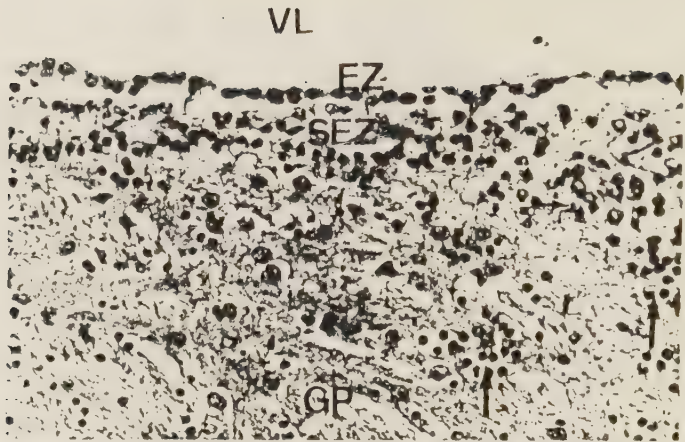


Abb.11: ENU + NX, 12 Wochen. Unscharf begrenzte subventrikuläre Gliazellvermehrung hauptsächlich in der Parenchymzone (gr. Pfeile). Lockere Verbindung zwischen gliomatösem Bezirk und EZ und SEZ (kl. Pfeil). H.E., 560x

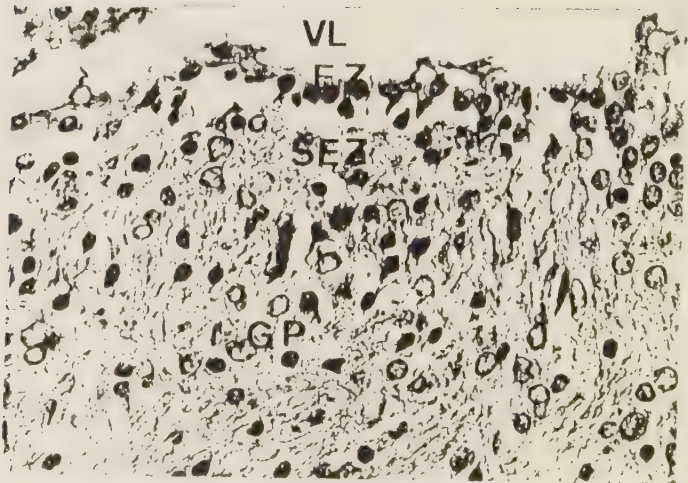


Abb.12: ENU + NX, 12 Wochen. Neoplastische Transformation von EZ, SEZ und angrenzendem Parenchym; die normale Gewebearchitektur mit voneinander zu unterscheidenden Zonen ist aufgehoben. H.E., 875 x



Abb.13: ENU + NX, 6 Monate. Breitflächiges Gliom (G) der okzipitalen Hemisphäre. H.E., 140 x

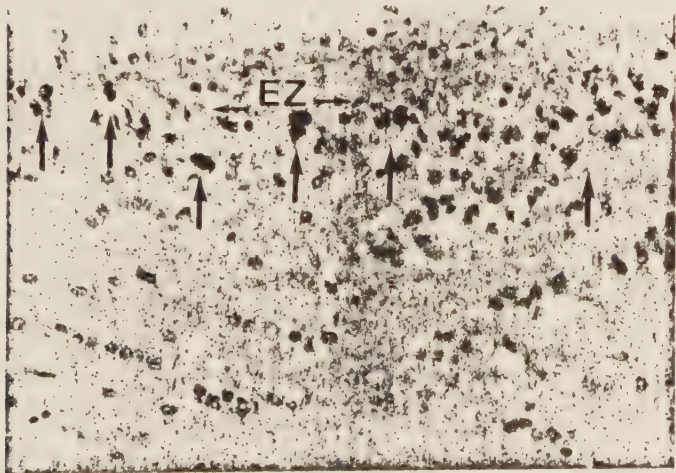


Abb.14: ENU, 6 Wochen. Autoradiographische Markierung der SEZ (gr. Pfeile). H.E., 560 x

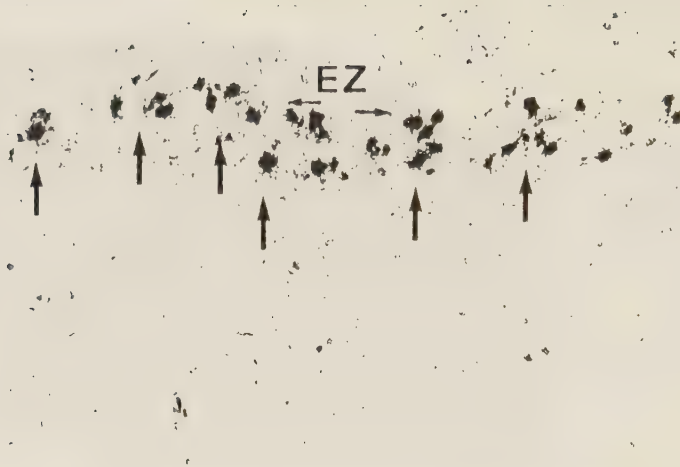


Abb.15: ENU + NX, 6 Wochen. Autoradiographische Markierung der SEZ (gr. Pfeile). Deutlich höhere Markierungshäufigkeit als in Abb.14. H.E., 560 x

Abkürzungen in den Abbildungen:

- VL - Ventrikellumen
- EZ - Ependymzone
- SEZ - Subependymzone
- GP - Gehirnparenchym
- HZ - Große Zellen mit hellem Kern
- DZ - Kleine Zellen mit dunklem Kern
- PN - Präneoplasie
- G - Gliom

4.5.1. Graphische Darstellungen

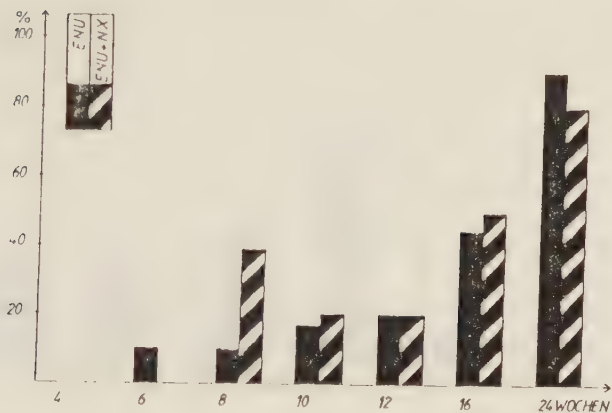


Abb.16: Häufigkeiten der aufgetretenen Gehirnveränderungen (Præneoplasien und Gliome) bei 4-24 Wochen alten Ratten nach ENU-Behandlung und nach ENU + NX-Behandlung.

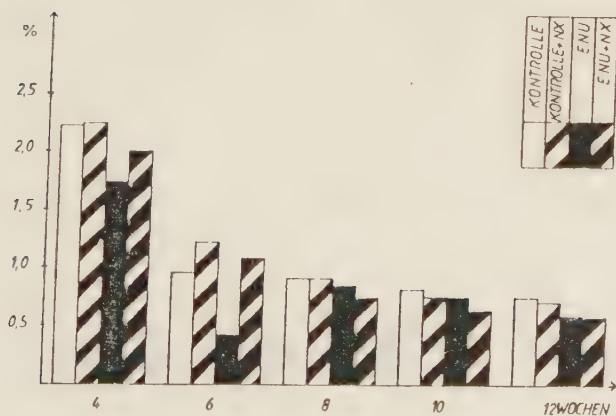


Abb.17: Prozentualer Anteil des Gehirngewichts am Körpergewicht bei den männlichen Versuchstieren zwischen 4 und 12 Lebenswochen.

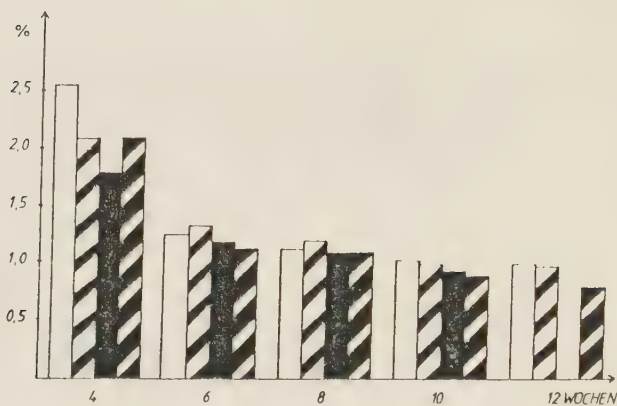


Abb.18: Prozentualer Anteil des Gehirngewichts am Körpergewicht bei den weiblichen Versuchstieren (Gruppeneinteilung s. Abb.17) zwischen 4 und 12 Lebenswochen.



Abb.19: Prozentualer Anteil des Thymusgewichts am Körpergewicht bei den männlichen Versuchstieren (Gruppeneinteilung s. Abb.17) zwischen 4 und 12 Lebenswochen.



Abb.20: Prozentualer Anteil des Thymusgewichts am Körpergewicht bei den weiblichen Versuchstieren (Gruppeneinteilung s. Abb.17) zwischen 4 und 12 Lebenswochen.



Abb.21: Prozentualer Anteil des Milzgewichts am Körpergewicht bei den männlichen Versuchstieren (Gruppeneinteilung s. Abb.17) zwischen 4 und 12 Lebenswochen.



Abb.22: Prozentualer Anteil des Milzgewichts am Körpergewicht bei den weiblichen Versuchstieren (Gruppeneinteilung s. Abb.17) zwischen 4 und 12 Lebenswochen.

4.5.3. Tabellen

Tab. 1: Anzahl der verwendeten Versuchstiere; Zahlen in Klammern () geben die Anzahl der jeweils mit 3-H-Thymidin vorbehandelten Tiere an.

Alter in Wochen	Kontrolle	Kontrolle + NX	ENU	ENU + NX
4	2 (2)	2 (2)	10 (2)	10 (2)
6	4 (2)	4 (2)	10 (2)	10 (2)
8	4 (2)	4 (2)	10 (2)	18 (2)
10	4 (2)	4 (2)	12 (2)	15 (2)
12	4 (2)	4 (2)	10 (2)	10 (2)
16			9	12
24			10	10
total	18 (10)	18 (10)	71 (10)	85 (10)

Tab. 2: Mittleres Körpergewicht (g) der männlichen Versuchstiere zwischen 4 und 12 Wochen.

Alter in Wochen	Kontrolle	Kontrolle + NX	ENU	ENU + NX
4	75	62	59,5 ± 1	75,5
6	203 ± 3	149 ± 2	130 ± 5	142 ± 1
8	205 ± 16	204 ± 6	177 ± 14	209,5 ± 0,5
10	234 ± 29,5	247 ± 2	217 ± 15	251,5 ± 11,5
12	263 ± 8	272 ± 13	260 ± 4,2	261 ± 0

Tab. 3: Mittleres Körpergewicht (g) der weiblichen Versuchstiere zwischen 4 und 12 Wochen.

Alter in Wochen	Kontrolle	Kontrolle + NX	ENU	ENU + NX
4	61	53	55 ± 2	70 ± 0
6	143 ± 3	119 ± 5	121 ± 1	123 ± 2
8	157 ± 4	150 ± 17	143,5 ± 5,5	152 ± 0
10	179 ± 7	175 ± 6	158,5 ± 8,5	176,5 ± 7,5
12	185 ± 13	185 ± 4		195,5 ± 7,5

Tab. 4: Gehirngewicht der männlichen Versuchstiere zwischen 4 und 12 Wochen (Mittelwerte in g).

Alter in Wochen	Kontrolle	Kontrolle + NX	ENU	ENU + NX
4	1,67	1,39	1,04	1,51
6	1,91	1,81	1,50	1,54
8	1,47	1,84	1,51	1,57
10	2,01	1,87	1,65	1,56
12	1,97	1,93	1,65	1,60

Tab. 5: Gehirngewicht der weiblichen Versuchstiere zwischen 4 und 12 Wochen (Mittelwerte in g).

Alter in Wochen	Kontrolle	Kontrolle + NX	ENU	ENU + NX
4	1,56	1,32	0,99	1,44
6	1,80	1,60	1,42	1,42
8	1,80	1,75	1,50	1,53
10	1,85	1,75	1,52	1,58
12	1,85	1,80	1,58	1,56

Tab. 6: Prozentualer Anteil des Gehirngewichts am Körpergewicht bei den männlichen Versuchstieren im Alter von 4 bis 12 Wochen.

Alter in Wochen	Kontrolle	Kontrolle + NX	ENU	ENU + NX
4	2,23	2,24	1,74 $\pm$ 0,06	2,0
6	0,95 $\pm$ 0,01	1,22 $\pm$ 0,01	0,39 $\pm$ 0,01	1,08 $\pm$ 0,01
8	0,90 $\pm$ 0,03	0,90 $\pm$ 0,02	0,85 $\pm$ 0,02	0,74 $\pm$ 0,02
10	0,83 $\pm$ 0,17	0,76 $\pm$ 0,01	0,77 $\pm$ 0,08	0,62 $\pm$ 0,03
12	0,76 $\pm$ 0,05	0,72 $\pm$ 0,02	0,62 $\pm$ 0,01	0,61 $\pm$ 0,02

Tab. 7: Prozentualer Anteil des Gehirngewichts am Körpergewicht bei den weiblichen Versuchstieren im Alter von 4 bis 12 Wochen.

Alter in Wochen	Kontrolle	Kontrolle + NX	ENU	ENU + NX
4	2,56	2,1	1,81 $\pm$ 0,01	2,1
6	1,26 $\pm$ 0,03	1,35 $\pm$ 0,05	1,17 $\pm$ 0,01	1,15 $\pm$ 0,03
8	1,15 $\pm$ 0,04	1,18 $\pm$ 0,08	1,09 $\pm$ 0,03	1,01 $\pm$ 0,02
10	1,04 $\pm$ 0,01	1,0 $\pm$ 0,03	0,95 $\pm$ 0,02	0,89 $\pm$ 0,01
12	1,0 $\pm$ 0,06	0,98 $\pm$ 0,03		0,8 $\pm$ 0,04

Tab. 8: Prozentualer Anteil des Thymusgewichts am Körpergewicht bei den männlichen Versuchstieren im Alter von 4 bis 12 Wochen.

Alter in Wochen	Kontrolle	Kontrolle + NX	ENU	ENU + NX
4	0,43	0,53	0,49 $\pm$ 0,03	0,33
6	0,27 $\pm$ 0,01	0,34 $\pm$ 0,04	0,39 $\pm$ 0,01	0,35 $\pm$ 0,01
8	0,24 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,03	0,24 $\pm$ 0,01
10	0,18 $\pm$ 0,03	0,20 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,03	0,19 $\pm$ 0,01
12	0,15 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,01

Tab. 9: Prozentualer Anteil des Thymusgewichts am Körpergewicht bei den weiblichen Versuchstieren im Alter von 4 bis 12 Wochen.

Alter in Wochen	Kontrolle	Kontrolle + NX	ENU	ENU + NX
4	0,49	0,55	0,50	0,39
6	0,39 $\pm$ 0,02	0,39 $\pm$ 0,03	0,36 $\pm$ 0,01	0,41 $\pm$ 0,03
8	0,31 $\pm$ 0,02	0,29 $\pm$ 0,01	0,35 $\pm$ 0,06	0,37 $\pm$ 0,01
10	0,24 $\pm$ 0,04	0,25 $\pm$ 0,03	0,29 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,05
12	0,21 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,04		0,20 $\pm$ 0,01

Tab. 10: Prozentualer Anteil des Milzgewichts am Körpergewicht bei den männlichen Versuchstieren im Alter von 4 bis 12 Wochen.

Alter in Wochen	Kontrolle	Kontrolle + NX	ENU	ENU + NX
4	0,41	0,55	0,42 $\pm$ 0,01	0,44
6	0,31 $\pm$ 0,01	0,43 $\pm$ 0,01	0,42 $\pm$ 0,01	0,39 $\pm$ 0,01
8	0,32 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,03	0,33 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,02
10	0,32 $\pm$ 0,06	0,19 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,05
12	0,25 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,04	0,23 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,01

Tab. 11: Prozentualer Anteil des Milzgewichts am Körpergewicht bei den weiblichen Versuchstieren im Alter von 4 bis 12 Wochen.

Alter in Wochen	Kontrolle	Kontrolle + NX	ENU	ENU + NX
4	0,36	0,52	0,51 $\pm$ 0,06	0,47
6	0,33 $\pm$ 0,01	0,40 $\pm$ 0,04	0,32 $\pm$ 0,01	0,35 $\pm$ 0,01
8	0,33 $\pm$ 0,03	0,24 $\pm$ 0,01	0,32 $\pm$ 0,02	0,32 $\pm$ 0,03
10	0,28 $\pm$ 0,01	0,19 $\pm$ 0,02	0,30 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,01
12	0,28 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,20		0,26 $\pm$ 0,05

Tab. 12: Prozentsatz der sich in Mitose befindlichen SEZ-Zellen im Vorderhirn von männlichen und weiblichen Ratten zwischen 4 und 24 Wochen; die Werte in Klammern () geben den Prozentsatz der mitotisch aktiven Zellen innerhalb von Gliomherden an (Mittelwerte $\pm$ Standardfehler).

Alter in Wochen	Kontrolle	Kontrolle + NX	ENU	ENU + NX
4 SEZ	1,72 $\pm$ 0,17	2,20 $\pm$ 0,70	2,40 $\pm$ 0,23	2,63 $\pm$ 0,27
6 SEZ	0,65 $\pm$ 0,10	2,51 $\pm$ 0,18	2,62 $\pm$ 0,30	2,12 $\pm$ 0,42
8 SEZ (GLIOME)	0,43 $\pm$ 0,05	3,77 $\pm$ 0,31	1,50 $\pm$ 0,26 (3,05 $\pm$ 0,28)	2,35 $\pm$ 0,31 (3,82 $\pm$ 0,35)
10 SEZ (GLIOME)	0,40 $\pm$ 0,06	1,03 $\pm$ 0,15	0,77 $\pm$ 0,34 (1,31 $\pm$ 0,30)	2,05 $\pm$ 0,22 (2,88 $\pm$ 0,45)
12 SEZ (GLIOME)	0,15 $\pm$ 0,04	0,55 $\pm$ 0,12	0,95 $\pm$ 0,30 (0,76 $\pm$ 0,26)	2,26 $\pm$ 0,30 (1,35 $\pm$ 0,40)
16 SEZ (GLIOME)	0,10 $\pm$ 0,03		0,71 $\pm$ 0,18 (0,50 $\pm$ 0,12)	1,44 $\pm$ 0,24 (0,82 $\pm$ 0,15)
24 SEZ (GLIOME)	0,10 $\pm$ 0,03		0,66 $\pm$ 0,19 (0,54 $\pm$ 0,10)	1,08 $\pm$ 0,25 (0,75 $\pm$ 0,22)

Tab.13: Markierungsindex, d.h. Prozentsatz der 3-H-markierten SEZ-Zellen des Vorderhirns bei den männlichen und weiblichen Versuchstieren zwischen 4 und 12 Lebenswochen (Mittelwerte $\pm$ Standardfehler).

Alter in Wochen	Kontrolle	Kontrolle + NX	ENU	ENU + NX
4	18,80 $\pm$ 0,52	18,55 $\pm$ 1,71	8,98 $\pm$ 2,55	16,16 $\pm$ 4,70
6	15,17 $\pm$ 5,33	24,91 $\pm$ 5,30	8,55 $\pm$ 3,74	21,44 $\pm$ 3,31
8	14,07 $\pm$ 2,21	20,90 $\pm$ 3,79	12,29 $\pm$ 2,36	9,65 $\pm$ 1,25
10	10,95 $\pm$ 1,92	23,69 $\pm$ 4,27	16,83 $\pm$ 3,04	17,31 $\pm$ 1,70
12	9,45 $\pm$ 1,66	19,27 $\pm$ 4,11	16,33 $\pm$ 3,04	22,57 $\pm$ 3,54

Tab. 14: Häufigkeiten der sequentiell erhobenen Befunde am Gehirn (Präneoplasien und Gliome) bei 4 bis 24 Wochen alten Ratten nach ENU-Behandlung und nach ENU + NX-Behandlung.

	Alter in Wochen							
	4	6	8	10	12	16	24	total
BEFUNDE NACH ENU								
Tierzahl	10	10	10	12	10	9	10	71
A:Präneoplasien u. fragliche Veränderungen (Anzahl) u. Prozentwerte	(0) 0%	(1) 10%	(0) 0%	(1) 8,3%	(1) 10%	(1) 11,1%	(1) 10%	(5) 7,0%
B:Gliome (Anzahl) u. Prozentwerte	(0) 0%	(0) 0%	(1) 10%	(1) 8,3%	(1) 10%	(3) 33,3%	(8) 80%	(14) 19,7%
Summe (Anzahl) u. Prozentwerte	(0) 0%	(1) 10%	(1) 10%	(2) 16,6%	(2) 20%	(4) 44,4%	(9) 90%	(19) 26,7%
BEFUNDE NACH ENU + NX								
Tierzahl	10	10	18	15	10	12	10	85
A:Präneoplasien u. fragliche Veränderungen (Anzahl) u. Prozentwerte	(0) 0%	(1) 10%	(2) 11,1%	(2) 13,3%	(1) 10%	(1) 8,3%	(1) 10%	(8) 9,4%
B: Gliome (Anzahl) u. Prozentwerte	(0) 0%	(0) 0%	(5) 27,8%	(1) 6,6%	(1) 10%	(5) 41,7%	(7) 70%	(19) 22,3%
Summe (Anzahl) u. Prozentwerte	(0) 0%	(1) 10%	(7) 38,9%	(3) 19,9%	(2) 20%	(6) 50%	(8) 80%	(27) 31,8%

5. DISKUSSION

5.1. Die durch Naltrexone (NX) bewirkte Wachstumssteigerung des Gehirns

Bei früheren Untersuchungen über den Einfluß von Opioidantagonisten auf ZNS-Entwicklungsvorgänge finden sich bei ZAGON und MCLAUGHLIN (1982, 1984b, 1986) und SCHMAHL et al. (1987) Ergebnisse, die besagen, daß Behandlung mit Naltrexone (NX) in der unmittelbaren Neonatalperiode zu einem Anstieg des Gehirngewichts bei 4 Wochen alten Ratten führt.

In der hier vorliegenden Arbeit wird die Wachstumssteigerung durch die relativ starke Zunahme des Gehirngewichts bei beiden mit NX behandelten Versuchsgruppen (II und IV) sichtbar. Dies ist bei den Kontrolltieren in der 6. Lebenswoche und bei den mit ENU + NX behandelten Tieren bereits in der 4. Woche der Fall. Somit ist die durch NX hervorgerufene kompensatorische Zunahme des Gehirngewichts nach der embryotoxischen Schädigung durch ENU nicht nur größer als bei den Kontrollen, sondern erfolgt auch um etwa 2 Wochen früher. Das Ausmaß der stärkeren Kompensationsleistung wurde von SCHMAHL et al. (1987) mit 12,9% angegeben, die Gewichtszunahme des Gehirns bei alleiniger NX-Behandlung beträgt dagegen nur 9,5%. Weiterhin ist auffallend, daß die größten Steigerungsraten bei der Gruppe II (NX) in der 6. Woche bei den männlichen Tieren beobachtet wurden, während die Effekte bei ENU + NX geschlechtsunabhängig waren. Diese Beobachtung ist jedoch vorsichtig zu beurteilen, da die Tieranzahl in den geschlechtsbezogenen Untergruppen relativ gering war.

5.2. Zelluläre Wirkungsmechanismen des NX auf die generative Zone des Großhirns

In der vorliegenden Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob dem Anstieg des Gehirngewichts ein entspre-

chend verändertes Proliferationsverhalten der germinativen Zone im Gehirn zugrunde liegt.

Neben den Verhältnissen einer ungestörten Entwicklung wurden auch teratogene und kanzerogene Effekte, hervorgerufen durch ENU, miteinbezogen.

Über das Proliferationsverhalten der germinativen Zone des Gehirns nach Applikation von NX liegen in der Literatur nur einige wenige Studien vor.

VÉRTES et al. (1982) bestimmten mittels Szintillationsmeßverfahren die 3-H-Thymidineinbaurate nach einmaliger NX-Applikation bei 14 Tage alten Ratten. Die erwartete Steigerung der Einbaurate wurde nur bis 3 Stunden p. appl. beobachtet, nach 6 Stunden registrierten die Autoren bereits subnormale Werte. Die Wirkung von NX war in diesem Fall von sehr kurzer Dauer.

KORNBLUM et al. (1987b), die ebenfalls mit der Szintillationsmeßmethode arbeiteten, stellten fest, daß nach einer 1, 2 oder 12 Tage andauernden NX-Behandlung überhaupt keine Veränderung der 3-H-Thymidineinbaurate stattfand.

ZAGON et al. (1987) führten ebenfalls eine kurzfristige Studie durch. Sie untersuchten mit autoradiographischen Methoden den Zeitraum der ersten 12 Stunden nach einer NX-Applikation. Dabei verwendeten sie die selbe Dosis wie in der hier vorliegenden Arbeit, nämlich 50mg NX/kg Körpergewicht. Im Gegensatz zu den oben angeführten Autoren beobachteten sie eine Erhöhung des 3-H-Thymidineinbaus über den gesamten Versuchszeitraum hinweg.

Leider existieren noch keine Befunde über längerfristige Wirkungen des NX nach 4, 6, 8 oder 10 Wochen.

Betrachtet man die oben geschilderten Ergebnisse, so erhält man keine Erklärung für den im Laufe meiner Untersuchungen festgestellten Proliferationsschub (vor allem zu erkennen an der Mitoserate) bei den NX-behandelten Tieren im Alter von 8 Wochen.

Einen möglichen Erklärungsansatz liefert die Beantwortung der Frage, welche Zellen an dieser Prolife-

rationswelle beteiligt sein könnten.

Angesichts der Entwicklungsprozesse am Großhirn der Ratte, die vorwiegend pränatal ablaufen (postnatal klingt - mit Ausnahme der Kleinhirnentwicklung - die Proliferationsaktivität allmählich aus), kann man konstatieren, daß es sich um gliale Zellen handeln muß. Neuronale Zellen kommen deshalb nicht in Frage, da ihre Reifeteilungen schon pränatal abgeschlossen sind.

Auch HAUSER et al. (1987) kamen zu dem Ergebnis, daß es sich bei den Zellen mit dieser ausgesprochenen postnatalen Proliferationsaktivität infolge des Einflusses von Naltrexone nur um Zellen glialen Ursprungs handeln kann.

Nachdem nun die Zellpopulation definiert ist, die die Fähigkeit besitzt, auf die NX-Behandlung in so deutlicher Weise reagieren zu können, muß geklärt werden, welcher Mechanismus die Gliazellen zu dieser späten Proliferation veranlaßt.

Einen ersten Hinweis, daß nicht das Opioidsystem selbst, sondern sekundäre Regulationsmechanismen zu diesen Wirkungen führen, gaben KORNBLUM et al. (1987b). Sie wiesen darauf hin, daß bei Verwendung der Opiode und Opioidantagonisten in vivo in den hier verwendeten Dosierungen diese die Freisetzung anderer Substanzen, wie Wachstumshormon (STH), Steroide und adrenerge Verbindungen beeinflusst haben könnten.

Setzt man nun also voraus, daß die Proliferation der subependymalen Zone (SEZ) in NX-behandelten Tieren einem sekundären Regelkreis unterliegt, muß man sich fragen, in welches Regulationssystem die Gliazellen integriert sind.

5.2.1. Die adrenerge Innervierung des Gehirns in der Perinatalperiode

Um zu einer Antwort zu gelangen, soll das von KORNBLUM et al. (1987b) oben erwähnte adrenerge System betrachtet werden.

Im Gehirn entwickelt sich bereits pränatal eine intensive adrenerge Innervierung. Zwischen dem 11. und 13. Tag p.c. ist ein Kerngebiet voll entwickelt, das im mesencephalen Stammhirn liegt. Bei diesem Kerngebiet, das nur aus einer einzigen Neuronenklasse mit ausschließlich noradrenergen Rezeptoren besteht, handelt es sich um den Locus coeruleus (MORRISON et al., 1978).

Die Neuronen des Locus coeruleus beginnen bei der Ratte am 13. Gestationstag, ihre Axone innerhalb besonderer Bahnen zunächst nach frontal und von dort in rostrokaudaler Richtung durch die graue Substanz zu senden. Sie führen so letztlich zu einer ausgeprägten noradrenergen Innervierung. Über aufsteigende Projektionsfasern setzt sich der Vorgang im gesamten Cortex fort, bis zu dessen vollständiger Innervierung (MORRISON et al., 1979).

Neben der Bildung der coeruleo-kortikalen Projektion entwickeln sich die zum noradrenergen System gehörenden adrenergen Rezeptoren auf den Zellen des in der Entwicklung befindlichen ZNS.

Die Entwicklung der adrenergen Rezeptoren beginnt bei der Ratte bereits pränatal; bei der Geburt ist eine kleine Anzahl an α - und β -adrenergen Rezeptoren vorhanden. Postnatal kommt es zu einer intensiven Bestückung sowohl der glialen als auch der neuronalen Zellen. Bei dem weitaus größten Teil der im Gehirn vorkommenden adrenergen Rezeptoren handelt es sich nach heute allgemein gültiger Auffassung um β -Rezeptoren, α -Rezeptoren spielen im Gehirn eine eher untergeordnete Rolle (HANSSON, 1985). Im Gegensatz dazu berichteten VAN CALKER et al. (1978) vom Vorhandensein beider Rezeptortypen im Gehirn der Maus.

Gemäß den Ergebnissen von PITTMAN et al. (1980) steigt die Dichte der β -Rezeptoren zwischen dem 10. und 21. Tag p.n. in markanter Weise an, bleibt dann für ca. 6 Wochen konstant, um anschließend langsam und kontinuierlich wieder abzunehmen.

Die höchste β -Rezeptordichte im zerebralen Cortex ist während der 3. und 4. Woche festzustellen. Von den 2

Rezeptorsubtypen β_1 und β_2 kommt im zerebralen Cortex fast ausschließlich der β_1 -adrenerge Typ vor (PITTMAN et al., 1980).

Die Lokalisation der β -adrenergen Rezeptoren beschränkt sich laut SHAIN et al. (1986) nicht nur auf Gliazellen, sondern betrifft auch die Neuronen. An den Nervenzellen sind in erster Linie die sogenannten Wachstumskegel mit den Rezeptoren besetzt.

5.2.2. Zusammenhang zwischen adrenergem System und Wachstumsvorgängen

Nach den Untersuchungen von MORRIS und SLOTKIN (1985) ist bekannt, daß im sich entwickelnden Gehirn eine eindeutige Korrelation besteht zwischen der Wirkung von adrenergen Agonisten (vor allem Agonisten der β_2 -adrenergen Rezeptoren) und dem Auftreten des Enzyms Ornithindecaboxylase (ODC). Die ODC gilt als Leitenzym für alle während der Entwicklung auftretenden Prozesse, die mit einer Zellproliferation einhergehen. Sie kann also bei Versuchen als biochemischer Marker für zelluläre Reifungsvorgänge eingesetzt werden.

MORRIS und SLOTKIN (1985) stellten fest, daß in der frühen neonatalen Entwicklungsphase, während der vor allem in den kaudalen Gehirnabschnitten eine intensive Zellproliferation stattfindet, die in diesen Regionen vorhandene ODC-Aktivität stark vom jeweiligen adrenergen Tonus abhängig ist. Die ODC-Aktivität wird also zeitlich vom Spiegel der adrenergen Agonisten beeinflusst.

Auf diese Weise ist ein eindeutiger Zusammenhang hergestellt zwischen β -adrenerger Aktivität und dem Wachstum. Die regulative Rolle der adrenergen Agonisten auf die Zellproliferation kommt auf eine differenzierte, phasenspezifische und bimodale Weise zustande. Wie SLOTKIN et al. (1987) festgestellt haben, existiert offensichtlich unmittelbar post natum ein niedriger Sympathikuston in den verschiedenen Organen, auch im Gehirn, der eine länger andauernde Zellproliferation ermöglicht. Wenn es

nun im Alter von ca. 3 Wochen in verschiedenen Organen sowie im Großhirn zu einem deutlichen Anstieg des Sympathikustonus kommt, so ist dies das Signal für die relativ abrupte Beendigung der Zellproliferationsvorgänge. Die ODC-Aktivität sinkt entsprechend ab.

5.2.3. Mögliche Interaktionen zwischen Opioidsystem und β -adrenergem System

Nachdem nun hinsichtlich der Wachstumsvorgänge die Funktionen von Opioiden und Opioidantagonisten einerseits und β -adrenergem System andererseits beschrieben wurden, muß ihr Zusammenwirken untersucht werden.

Es ist bekannt, daß Neuropeptide (vor allem Enkephalin) bei der Interaktion mit ihren Rezeptoren auf Astrozyten die für β -adrenerge Agonisten typischen Effekte, nämlich die Steigerung des intrazellulären zyklischen AMP, verhindern können.

Durch die Opioide kommt es also zur Dämpfung der β -adrenergen Wirkung (ROUGON et al., 1983).

Daneben ist weiter bekannt, daß Opioide bei Gliazellen zu einer signifikanten Verringerung der β -Rezeptordichte führen können (REGGIANI et al., 1987). Dieses Phänomen wird auch als adrenerge Tachyphylaxie, d.h. Unempfindlichkeit, bezeichnet, da die Gliazellen durch die verminderte Rezeptoranzahl vor einer adrenergen Überreizung geschützt werden.

Neben diesen indirekten Interaktionen von Opioidsystem und Neurotransmittersystem, die über sekundäre Mechanismen ablaufen, sind auch direkte Effekte beschrieben. Bei Applikation des Opioidantagonisten NX unter Streßbedingungen, die zweifellos bei den in dieser Arbeit durchgeführten Methoden auch vorlagen, kommt es zu einer drastischen Erhöhung des Noradrenalinpiegels. Eine solche Erhöhung wurde von SHARMA et al. (1988) im limbischen System und von ABERCROMBIE und JACOBS (1988) im Locus coeruleus gefunden. Dies zeigt, daß NX direkt das adrenerge System beeinflussen kann. Da jede, besonders jede

langandauernde Erhöhung des Spiegels adrenerger Agonisten an den mit β -Rezeptoren ausgestatteten Zellen zu einer Verlagerung (Internalisierung) der Rezeptoren in die Zellmembran hinein und somit zu einer Tachyphylaxie führt (SIBLEY und LEFKOWITZ, 1988), entspricht die Wirkung des streßbedingt hohen Noradrenalinpiegels völlig den oben beschriebenen Interaktionseffekten von β -adrenergem und Opioidsystem.

Somit ergibt sich vermutlich folgender chronologischer Ablauf der Ereignisse an der Subependymzone (SEZ) während der chronischen NX-Behandlung:

Laut verschiedener Veröffentlichungen (zusammengefaßt unter 2.5. in der vorliegenden Arbeit) ist durch postnatale NX-Behandlung zunächst eine Verminderung der Dichte der μ -Opioidrezeptoren zu erwarten, auf die aber bei chronischer Applikation über 4 Wochen eine Steigerung der Rezeptordichte folgen dürfte. Mit der Erhöhung der Dichte einher geht auch eine erhöhte Opioidsensitivität der rezeptortragenden Zellen.

Diese anfänglich ausgelöste Verringerung der μ -Rezeptordichte durch NX, zusammen mit den akuten, streßbedingten Wirkungen der Applikation auf das β -adrenerge System (Noradrenalin-Anstieg, HERRENKOHL et al., 1988), führt auf einem gleichsam synergistischem Weg zur Steigerung des adrenergen Tonus im Vorderhirn der so behandelten Tiere und somit im Sinne der von SLOTKIN et al. (1988) postulierten Wachstumsregulation zu einem Stillstand der Proliferationsaktivität der SEZ.

Mit zunehmender Chronizität der NX-Behandlung wird einerseits eine Zunahme der μ -Rezeptorzahl und andererseits eine β -adrenerge Tachyphylaxie erwirkt. Beide Rezeptorwirkungen haben zur Folge, daß eine lang andauernde kompensatorische Zellproliferation in zunehmendem Maß ermöglicht wird (SLOTKIN et al., 1988).

Nach den Untersuchungen von BARTOLOME et al. (1986, 1987) erniedrigt β -Endorphin offensichtlich die ODC-Aktivität im Gehirn neugeborener Tiere, während N-Ace-

tyl- β -Endorphin die ODC-Aktivität stimuliert. Es ist zu vermuten, daß NX in das sehr sensible Gleichgewicht zwischen β -Endorphin und seinen Metaboliten N-Acetyl- β -Endorphin eingreift und ein weitaus stärkerer Antagonist der β -Endorphinwirkung ist, so daß die durch N-Acetyl- β -Endorphin hervorgerufene Stimulierung der ODC unter NX-Einwirkung verstärkt in den Vordergrund tritt. Morphologisch entspricht dem dann eine erhöhte Proliferationsaktivität der Matrixzone.

5.3. Histogenese der Veränderungen der telencephalen SEZ durch NX-Applikation

Diese Vorgänge spielen sich höchstwahrscheinlich in den von mir untersuchten Kontrollgehirnen in der Weise ab, daß es bereits gegen Ende der NX-Applikation im Alter von 4 Wochen zu einer im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen erhöhten Proliferation der SEZ kommt. Erkennlich ist dies an der Mitoserate von 2,20 bei Gruppe II (Kontrolle + NX) gegenüber 1,72 bei Gruppe I (Kontrolle) bei 4 Wochen alten Tieren.

In den darauffolgenden Wochen kommt es offenbar zu einem Rebound-ähnlichen Aufschwung der Mitoseaktivität nach NX-Behandlung, die in der 8. Woche p.n. in dem Wert $3,77 \pm 0,31\%$ bei Kontrolle + NX (Gruppe II) gipfelt, während die Mitoserate bei den unbehandelten Tieren (Gruppe I) bereits auf $0,43 \pm 0,05\%$ zurückfällt.

Die physiologische Steigerung des β -adrenergen Tonus, wie sie bei den unbehandelten Kontrolltieren (Gruppe I) bereits um die 3. Woche p.n. zu erwarten ist, kommt bei den NX-behandelten Tieren offensichtlich erst nach Beendigung der NX-Behandlung zum Durchbruch.

Nimmt man an, daß die Steigerung des adrenergen Tonus bei den NX-behandelten Tieren (Gruppe II, IV) nach Abschluß dieser Behandlung eine vergleichbare Zeit nach der Geburt wie bei den unbehandelten Kontrollen beansprucht, also etwa 3-4 Wochen, so wäre die abrupte Beendigung der hohen Mitose- und Markierungsraten ab der

8. Woche plausibel zu erklären.

Bei dieser Proliferationsdynamik der SEZ ist besonders bemerkenswert, daß trotz der hohen Mitose- und Markierungsfrequenzen bei den behandelten Tieren kein von den Kontrollen abweichendes histologisches Bild der Ependymzone (EZ) und Subependymzone (SEZ) zustande kommt. Außer einer gewissen Verbreiterung und besseren Durchblutung beider Zonen bewegen sich alle Kriterien im Normbereich. Dies bedeutet also, daß während der Phase der SEZ-Proliferation um die 6. bis 8. Woche keine am histologischen Aufbau von EZ und SEZ beteiligte Zellfraktion einer bevorzugten Proliferation unterliegt.

Bei den 4 Wochen alten allein mit ENU behandelten Tieren war die Markierungshäufigkeit nur halb so groß wie bei den Kontrollen ($8,98 \pm 2,55\%$ gegenüber $18,86 \pm 0,52\%$). Dies ist als stark herabgesetzte Proliferationsaktivität zu interpretieren.

Unter NX-Einfluß normalisieren sich der Markierungsindex und die Mitoserate bei den ENU-behandelten Tieren bis zur 4. Woche nahezu (Markierungshäufigkeit $16,16 \pm 4,70\%$ bei ENU + NX und $18,55 \pm 1,71\%$ bei Kontrolle + NX, Mitoserate $2,63 \pm 0,27\%$ bei ENU + NX und $2,20 \pm 0,20\%$ bei Kontrolle + NX).

Die von SCHIFFER et al. (1980) beobachtete Zunahme der Mitoseaktivität nach ENU-Behandlung vom 30. Lebenstag an kann auch in den hier vorliegenden Ergebnissen mit $2,40 \pm 0,23\%$ bei ENU gegenüber $1,72 \pm 0,17\%$ bei den Kontrollen im Alter von 4 Wochen festgestellt werden. Diese sehr hohe regenerative Proliferationsaktivität ist möglicherweise durch die NX-induzierte Veränderung der Opioidrezeptordichte zusammen mit den sekundären Wirkungen auf das β -adrenerge System zu erklären.

Dieser Effekt des NX hält bis zur 6. Woche an, wobei keine nennenswerten Unterschiede, weder bei Markierungs- noch bei Mitoseindex, gegenüber den Kontrollen auftraten.

Offensichtlich kommt es in der 8. Woche bei mit ENU + NX behandelten Tieren zum Sistieren dieser regenerativen

Potenz, was durch den Abfall des Markierungsindex auf $9,65 \pm 1,25\%$ gekennzeichnet ist, während der Mitoseindex noch unverändert hoch bleibt. Ob der Abfall der Markierungshäufigkeit mit der oben angesprochenen Erhöhung des Sympathikustonus zusammenhängt, kann nur spekulativ und ohne Beweisführung angedeutet werden.

Auffallend ist jedoch, daß in dieser Zeitspanne zwischen der 4. und der 8. Woche, die mit ENU + NX behandelten Tiere weitaus häufiger Unregelmäßigkeiten im histologischen Aufbau ihrer EZ und SEZ erkennen lassen. Diese Unregelmäßigkeiten stellen sich als Vermengung von EZ- und SEZ-Zellen an Stellen dar, an denen die EZ in ihrer Kontinuität unterbrochen ist. Darüberhinaus scheint in dieser Periode die Proliferation der SEZ meist zugunsten der großen Zellen mit hellem Kern zu erfolgen. Diese Zellfraktion schiebt sich deutlich in den Vordergrund und nimmt besonders an lädierten Lokalisationen einen intensiven Kontakt mit der EZ auf. Von einer solchen Beteiligung ependymaler Zellen an den Mikrotumoren berichteten auch bereits PILKINGTON und LANTOS (1979).

Die kleinen polygonalen Zellen mit dunklem Kern dagegen spielen eine untergeordnete Rolle, ja sie scheinen geradezu in die distale SEZ abgedrängt zu sein.

Es ist bemerkenswert, daß in der 8. Woche die Markierungswerte der scheinbar unveränderten SEZ geringer sind als bei den Tieren mit alleiniger ENU-Behandlung und sich zur 10. Woche hin wieder an jene angleichen. So entsteht von dieser Zeitspanne der Eindruck, als hätte die vorausgegangene NX-Behandlung keinen nachhaltigen Einfluß auf das Proliferationsverhalten der SEZ gehabt.

Lediglich die Mitosewerte der Gruppe IV signalisieren einen ausdrücklichen proliferationssteigernden Effekt der Behandlung, der vermutlich durch NX direkt oder indirekt über das β -adrenerge System ausgelöst wurde.

Beginnend ab der 8. und sich fortsetzend bis zur 10. Woche kommt es bei Tieren mit ENU-Behandlung zur Entwicklung von kleinsten Gliomherden, die im histologischen Bild noch einen deutlichen Zusammenhang zur

scheinbar unveränderten SEZ erkennen lassen.

Auch LANTOS beschrieb 1977 das Auftreten solcher frühesten Läsionen im Alter von 8 Wochen und bezeichnete sie als "early neoplastic proliferations" (ENP). LANTOS und PILKINGTON (1979) berichteten von zahlreichen Mitosen in den ENP; die Ergebnisse meiner Versuche bestätigen dies mit Mitoseraten von $3,05 \pm 0,28\%$ bei ENU-Behandlung und $3,82 \pm 0,35\%$ bei ENU + NX-Behandlung in den Gliomherden. Diese beiden Werte sind die höchsten von allen im Verlauf des Versuchs ermittelten.

Es ist jedoch auffallend, daß die Mitoseindizes der Gliomherde bei allein mit ENU behandelten Tieren in der 8. und insbesondere in der 10. Woche deutlich niedriger sind als die entsprechenden bei Tieren mit ENU + NX-Behandlung.

Das bedeutet, daß man bei den letzteren davon ausgehen kann, daß die sich aus dieser nämlichen Region entwickelnden Gliomfoci einer ausgeprägten Regulation ihres Wachstumsverhaltens durch NX unterliegen. Folglich ist anzunehmen, daß direkt oder indirekt NX-sensible Zellen an der Bildung der Mikrotumoren beteiligt sind, auch wenn sie sich morphologisch noch nicht von den anderen (durch NX nicht beeinflussbaren) Zellen dieser fokalen Veränderungen unterscheiden.

Bei der sequentiellen Untersuchung der histologischen Veränderungen fällt auf, daß in beiden ENU-Gruppen (III und IV), vor allem aber in der zusätzlich mit NX behandelten Gruppe ein enger Kontakt zwischen Ependym- und Subependymzellen besteht. Dies ist besonders deutlich an Orten mit EZ-Läsionen. Dieser enge Kontakt kann dabei auch Formen der Vermengung beider Zonen annehmen, so daß es nicht möglich ist, festzustellen, ob und wie weit sich die Ependymzellen in die SEZ absenken, oder, ob Zellen der SEZ den Oberflächenabschluß zum Ventrikellumen substituieren.

Daneben fällt auf, daß ein besonderer Zelltyp, die kleinen polygonalen Zellen mit dunklem Kern, meist in die

Tiefe der SEZ verlagert ist.

Wie vergleichende Untersuchungen mit Röntgenbestrahlung anstelle von ENU (MIASKOWSKI, 1988) zeigen, ist gerade diese Zellfraktion an den regenerativen Prozessen der geschädigten SEZ beteiligt. Dies geschieht mit einer ausgesprochenen lokalisatorischen Präferenz, indem sich diese kleinen polygonalen Zellen zwischen die EZ und die distale SEZ schieben.

Vergleicht man die strahlenbedingten Läsionen mit den Schäden nach ENU + NX-Behandlung, so muß die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß die topographische Besonderheit der kleinen polygonalen Zellen in den Strahlenläsionen auch wesentlich zu einer Normalisierung des durch NX ausgelösten Proliferationsschubs beiträgt.

Im Falle der ENU-behandelten Tiere ist durch das Fehlen bzw. durch die Dystopie der kleinen, polygonalen Zellen eine solche Regulation vermutlich nicht möglich.

Es bleibt demnach zu postulieren, daß die enge Verbindung zwischen EZ-Zellen und den großen SEZ-Zellen mit hellem Kern in proliferationsdynamischer Hinsicht eine Kondition darstellt, die auf einen Reiz hin eine langandauernde Mitoseaktivität selektiv dieser letztgenannten Zellen ermöglicht.

In Anlehnung an die Befunde von BURGER et al. (1988), die dem Vorläufer der Oligodendroglia die ENU-induzierte Transformation zuschreiben, kann man vermuten, daß die hier beobachteten großen Zellen mit hellem Kern zum Teil diese Stammzellen der kanzerogenen Transformation repräsentieren. Nach ENU + NX-Behandlung sind in der 12. Woche sehr hohe Mitosewerte zu beobachten, es treten sogar die höchsten Markierungsindizes des gesamten Versuchszeitraums in der sogenannten unveränderten SEZ auf. Man kann deshalb vermuten, daß in diese SEZ ein weiteres Stammzellpotential mitotisch aktiver Zellen integriert ist, das möglicherweise selbst keine ENU-induzierte Transformationspotenz besitzt, aber noch über einige Wochen, evtl. Monate hinweg durch die erhöhte Teilungsrate einen synergistischen Reiz auf ENU-transfor-

mierte Gliazellen ausübt.

Die Vermutung vom Vorhandensein einer solchen Zellpopulation steht in Übereinstimmung mit der Feststellung von PILKINGTON und LANTOS (1979), wonach undifferenzierte SEZ-Stammzellen an der Genese der Mikrotumoren beteiligt sind. Die in diesen SEZ-Gebieten selbst nach 24 Wochen bei ENU + NX-Behandlung im Vergleich zur ENU-Behandlung nahezu doppelt so hohe Mitoserate, und die zur selben Zeit in den Gliomen bei ENU + NX geringfügig höhere Mitosefrequenz belegen diese hohe Teilungsaktivität jener SEZ-Zellen.

Zusammenfassend ist also festzustellen, daß nach ENU-Applikation eine Fraktion großer Zellen mit hellem Kern existiert, die sich morphologisch durch engen Kontakt mit der EZ auszeichnet und als Ort früh auftretender histologischer Unregelmäßigkeit auf eine mögliche neoplastische Transformation hinweist.

In Versuchen mit zusätzlicher NX-Behandlung stellt sich heraus, daß diese Zellart besonders leicht zur Proliferation anzuregen ist, wobei hier die Möglichkeit einer veränderten μ -Rezeptordichte und/oder -affinität diskutiert werden könnte. Ein entsprechendes Postulat wurde auch bereits von ZAGON und MCLAUGHLIN (1986) aufgestellt. Vielleicht ist diese Zellfraktion aufgrund ihrer durch die embryotoxische Wirkung bedingten topographischen Nähe zu den EZ-Zellen dazu befähigt, die NX-Behandlung mit einer langandauernden Mitoseaktivität zu beantworten.

Ab der 8. Woche traten solche Zellen in Form von Mikrogliomen in Erscheinung und sind dann auch durch ihre weiterhin sehr hohe Mitosefrequenz von den übrigen SEZ-Zellen zu unterscheiden. Eine nähere Typisierung dieser Zellfraktion des Subependyms muß weiteren, immunhistochemischen Untersuchungen vorbehalten bleiben.

5.4. Der tumorpromovierende Effekt des NX bei der Entstehung von Gliomen

Bei Analyse der Markierungs- und Mitosehäufigkeiten der Gruppen III und IV (ENU-Behandlung mit und ohne NX) fällt auf, daß die Gliome einen außerordentlich hohen Mitoseindex aufweisen, der wiederum bei den mit ENU + NX behandelten Tieren signifikant höher als bei den nicht mit NX behandelten Tieren ist. Dagegen geht der Markierungsindex in der sogenannten unveränderten SEZ stark zurück. In der mit ENU + NX behandelten Gruppe ist er sogar signifikant kleiner als in der ENU-Gruppe.

Dies läßt den Verdacht aufkommen, daß bei den 6 Wochen alten ENU + NX-Tieren ein großer Teil der erhöhten Proliferationskapazität der noch uniform erscheinenden SEZ eigentlich denjenigen Zellen zuzuschreiben ist, die erst ab der 8. Woche als eindeutig gliomatös einzustufen und als solche auch morphologisch diskriminierbar sind.

Da auch gleichzeitig ab der 8. Woche die Inzidenz der Gliome in der Gruppe IV (ENU + NX) höher ist als nach ENU-Behandlung allein, liegt der Schluß nahe, daß eine durch NX ausgelöste Proliferationssteigerung direkt mit der Gliomentstehung in Verbindung steht. Mit anderen Worten, man muß aus den vorgelegten Ergebnissen folgern, daß die durch ENU transformierten Glioblasten diejenigen Zellen sind, die sich gegenüber einer NX-Behandlung im Hinblick auf eine gesteigerte Proliferation besonders sensitiv verhalten.

In den Gehirnnarealen, die durch das Auftreten kleiner gliomatöser Foci gekennzeichnet sind, ist in der 8. bis 10. Woche die Mitosehäufigkeit in diesen Herden deutlich höher als in den benachbarten unveränderten Gebieten. Ab der 12. Woche jedoch ist die Mitoseaktivität in diesen Bezirken niedriger als in der scheinbar unveränderten SEZ. Dies bedeutet, daß die gliomatösen Zellen bei Tieren mit ENU + NX-Behandlung aus einer Zellpopulation stammen, die NX-empfindlich ist. Daneben läßt sich davon ableiten, daß zur Genese der Gliome offensichtlich keine

kontinuierliche Mitoseerhöhung erforderlich ist. Daraus folgt der Schluß, daß die Persistenz dieser Herde - sofern diese nicht nach anfänglicher, NX-bedingter Proliferationsstimulierung ab der 12. Woche regressive Tendenz zeigen - in dieser "Spätphase" auf eine längere Zykluszeit sowie auf eine Erhöhung der Wachstumsfraktion und nicht auf gesteigerte mitotische Aktivität zurückzuführen ist.

Davon ausgehend, daß die Glioblasten die NX-sensitiven Zellen darstellen, muß man sich der Frage zuwenden, ob sich die Glioblasten durch eine veränderte Dichte der Opioidrezeptoren und/oder β -adrenergen Rezeptoren auszeichnen.

Obgleich dies im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden konnte, wäre es durchaus denkbar, daß solche potentiellen Gliomzellen eine erhöhte Dichte an μ -Rezeptoren aufweisen und dadurch relativ unempfindlich gegenüber β -adrenergen Einflüssen werden (ROUGON et al., 1983; REGGIANI et al., 1987).

Einen solchen Zusammenhang vermuteten bereits MCLAUGHLIN und ZAGON (1987), indem sie nach NX-Behandlung eine Hochregulierung der μ -Rezeptordichte von nicht näher definierten Zellen beobachteten.

Im Sinne der von SLOTKIN et al. (1987) postulierten Proliferationsmechanismen wären diese Zellen mit hohem μ -Rezeptorbesatz und gleichzeitig niedriger β -Rezeptordichte prädisponiert für eine langandauernde Teilungsaktivität.

Da in den von mir untersuchten Gehirnen nach ENU + NX-Behandlung sowohl die unverändert erscheinende SEZ als auch die gliomatösen Foci andauernd höhere Mitosewerte aufweisen als in Gehirnen von allein mit ENU behandelten Tieren, kann dies als ein erster Hinweis auf eine tumorpromovierende Wirkung des NX gewertet werden. Ob dies tatsächlich mit einer Veränderung des Rezeptorstatus einhergeht, konnte hier nicht untersucht werden.

Auch weitere histologische Befunde bestätigen die Annahme eines durch NX bewirkten selektiven Wachstumsvorteils

potentieller Gliomzellen:

Ermittelt man die Häufigkeit des zeitlichen Auftretens der histologisch abgesicherten Präneoplasien und manifesten Gliome, so findet sich einzig in der 8. Woche eine deutliche Erhöhung der Tumorinzidenz bei ENU + NX-Tieren. Letztere ist um das 3,9-fache höher als nach ENU-Behandlung allein. Eine solche Tumorpromotion wird zu keinem anderen Zeitpunkt, weder früher noch später, beobachtet. Dies muß deshalb deutlich hervorgehoben werden, da die zur 8. Woche feststellbare promovierende Wirkung von NX in einer summarischen Zusammenfassung der Tumorinzidenzen aller Altersstufen kaum mehr in Erscheinung tritt.

Die bei 24 Wochen alten Tieren ermittelten Summenwerte der Gliomhäufigkeiten lagen bei ENU-Tieren bei 26,7%, bei ENU + NX-Tieren bei 31,8%. Sie unterschieden sich demnach nicht signifikant.

Die tumorpromovierende Wirkung von NX wird auch daraus erkenntlich, daß sich die in der betreffenden Versuchsgruppe (IV) entwickelnden Gliome durch deutliche Anaplasie, und damit durch einen höheren Grad der Malignität auszeichnen.

Naltrexone hat also einen tumorpromovierenden Effekt, zumindest in der Neonatalperiode. Ob dies auch für spätere Lebensphasen und für andere Organe zutrifft, kann hier nicht beantwortet werden.

Zusammenfassend kann die wachstumsstimulierende Wirkung von NX auf Tumoren bestätigt werden, die erstmals von ZAGON und MCLAUGHLIN 1983 (b) und 1984 (a) (jedoch nur im Dosisbereich >10 mg/kg Körpergewicht) beobachtet wurde.

Die teils widersprüchlichen Befunde jener Untersuchungen beruhen auf dem Umstand, daß die oben genannten Autoren Transplantationstumoren verwendeten, deren Wachstumsphase (bedingt durch regressive Veränderungen, progressive Selektion von Subklonen, Beteiligung von Wirtsstromagewebe) nicht definierbar war. Dementsprechend sind starke Variationen im Versuchsergebnis nicht

zufällig, sondern methodisch bedingt.

In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch die Effekte von NX auf in situ wachsende Tumoren untersucht und der Opioidantagonist darüberhinaus in der sogenannten Latenzperiode appliziert. Während dieser Phase entscheidet sich, ob initial geschädigte Zellen einer progressiven Transformation unterliegen.

Die Blockade der μ -Rezeptoren durch NX in dieser Latenzperiode kann als ein tumorpromovierender Kofaktor angesehen werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird das Wachstumsverhalten der germinativen Zone des Großhirns neugeborener Ratten unter langfristiger Blockade der Opioidrezeptoren untersucht. Diese haben vermutlich an der perinatalen Wachstumsmodulation des Nervensystems einen wichtigen Anteil.

Ein Teil der untersuchten Ratten wurde während der Fetalentwicklung (14. Gestationstag) einer Einzeldosis des diaplazentar wirkenden Karzinogens Ethylnitrosoharnstoff (ENU) ausgesetzt. Vom 1. bis zum 28. Lebenstag wurde diesen Tieren, ebenso wie Kontrollen, täglich der μ -Rezeptorblocker Naltrexone (NX) appliziert. An 4-24 Wochen alten Tieren wurden Sektionen durchgeführt. Die Gehirne wurden im Großhirnbereich histologisch untersucht. Von einigen Tieren, die 3-H-Thymidin erhalten hatten, wurden Autoradiographien erstellt, um das Proliferationsverhalten der subependymalen Zellschicht quantitativ beurteilen zu können. Es wurde auch der prozentuale Anteil der mitotisch aktiven Zellen in der Subependymzone ermittelt. Auftretende Großhirntumoren wurden nach ihrer Größe klassifiziert und sequentiell erfaßt.

Bei den Ergebnissen waren nach Naltrexone-Behandlung höhere Gehirngewichte (am deutlichsten ausgeprägt bei den mit ENU + NX behandelten Tieren) und eine gesteigerte Proliferationsdynamik der subependymalen Zellschicht zu beobachten.

Der wachstumssteigernde Effekt von NX auf das Gehirn der Neugeborenen kommt vermutlich nicht direkt durch die Blockade der Opioidrezeptoren zustande. Da bekannt ist, daß zwischen diesen Rezeptoren und denen des β -adrenergen Systems funktionelle Kopplungen bestehen, wird diskutiert, inwieweit die hier gefundenen Wachstumseffekte durch eine sekundäre Beeinflussung des letztgenannten Systems erklärbar sind.

Bei den Ratten mit ENU + NX-Behandlung wurden im Alter

von 4-8 Wochen im Gegensatz zu den nur mit ENU behandelten Tieren histologisch deutlichere Unregelmäßigkeiten im Aufbau der subependymalen Zone beobachtet. Ab der 8. Woche entwickelten sich hier bevorzugt pathologische Veränderungen entweder in Form von fokalen Gliazellzunahmen oder von Mikrogliomen. An diesen Neoplasien waren stets große Gliazellen mit hellen Kernen beteiligt. Die Mitoserate und die Inzidenz der gliomatösen Foci war nach ENU + NX-Behandlung signifikant höher als nach ENU-Behandlung allein. Daraus ist zu folgern, daß an der Gliomentstehung NX-sensible Gliazellen beteiligt sind, die durch NX zur Proliferation angeregt werden. Demzufolge besitzt NX bei der Gliomentstehung eine tumorpromovierende Wirkung.

Die Kernfrage, von der in der Problemstellung dieser Arbeit ausgegangen war, lautete, welche Wirkung Opiode auf die Entwicklung von Tumoren haben. Wenn der aus praktischen Erwägungen heraus verwendete Opioidantagonist Naltrexone tumorfördernde Eigenschaften hat, müßten Opiode als Agonisten zu den gegenteiligen Effekten, also zu einem inhibitorischen Einfluß führen.

Ob dies zutrifft, muß in weiteren Studien über die Wirkung direkter Opioidrezeptorerregung an Gliazellen nachgewiesen werden.

7. SUMMARY

"The Growth Pattern of the Germinative Zone of the Telencephalon Subsequent to Prenatal Application of Ethylnitrosourea and Postnatal Blockade of the Opioid Receptors in the Rat"

The present paper concerns with an investigation about the growth pattern of the cerebral germination zone during long-term blockade of the opioid receptors, which presumably participate in an essential manner in the perinatal modulation of nervous system growth.

A part of the examined rats on the 14th day of gestation was exposed to a single dose of the diaplacentally active carcinogen ethylnitrosourea (ENU). From first day to day 28 p.n. half the animals got, as well as controls, a daily dose of the μ -receptor blocker Naltrexone (NX). Rats at the age of 4 to 24 weeks were dissected. The brains were examined histologically within the region of the cerebrum.

From some animals, those which had received 3-H-thymidine, histoautoradiographic sections were produced in order to assess quantitatively the proliferation of the subependymal layer. Also the percentage of mitotically active cells in the subependymal layer was determined. Arising cerebral tumors were classified according to their size and registered sequentially.

Subsequent to NX-treatment higher brain weights (most remarkable after ENU + NX-treatment) and an increased dynamics of the proliferation of the subependymal layer were observed. The effect of enhanced brain growth in offspring due to NX is presumably not the direct consequence of the opioid receptor blockade. Since it is known that functional connections are existing between these latter receptors and the receptors of the adrenergic system, it is discussed in as far the observed growth effects are explainable with a secondary influence of the adrenergic system.

At an age of 4 to 8 weeks in rats with ENU + NX-treatment there were found greater histological irregularities in the structure of the subependymal zone than in rats with only ENU-treatment. From the 8th week on in the ENU + NX-animals pathological alterations either as focal increase in the number of glial cells or as microgliomas developed. Large glial cells with light nuclei did always participate in these neoplasms. The ratio of mitotically active cells and the frequency of glioma foci was significantly higher after ENU + NX- than after only ENU-application. Therefore it can be concluded that NX-sensible glial cells participate in the genesis of gliomas. Accordingly NX possesses a tumor-promoting influence on the pathogenesis of gliomas.

The pivotal question in this study has been the effects of opioids on development of tumors. If NX, which was used because of practicable considerations has a tumor-promoting property, opioids themselves should consequently lead to the contrary effects hence to an inhibitory influence. Whether this thesis holds true must be proved with further studies about the effect of direct opioid receptor excitation on glial cells.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Abercrombie E.D. und Jacobs B.L.: Systemic naloxone administration potentiates locus coeruleus noradrenergic neuronal activity under stressful but not under non-stressful conditions.
Brain Res. 441, 362-366 (1988)
- Au W., Soukup S.W. und Mandybur T.I.: Excess chromosome No 4 in ethylnitrosourea-induced neurogenic tumor lines of the rat.
J. Natl. Cancer Inst. 59, 1709-1716 (1977).
- Auguy-Valette A., Cros J. Gouarderes C., Gout R. und Pontonnier G.: Morphine analgesia and cerebral opiate receptors: a developmental study.
Br. J. Pharmac. 63, 303-308 (1978).
- Aylsworth C.F., Hodson C.A. und Meites J.: Opiate antagonists can inhibit mammary tumor growth in rats.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 161, 18-20 (1979)
- Bardo M.T., Bhatnagar R.K. und Gebhart G.F.: Opiate receptor ontogeny and morphine-induced effects: influence of chronic footshock stress in preweanling rats.
Dev. Brain Res. 1, 487-495 (1981)
- Bardo M.T., Bhatnagar R.K. und Gebhart G.F.: Differential effects of chronic morphine and naloxone on opiate receptors, monoamines, and morphine-induced behaviors in preweanling rats.
Dev. Brain Res. 4, 139-147 (1982)
- Bardo M.T., Bhatnagar R.K. und Gebhart G.F.: Age-related differences in the effect of chronic administration of naloxone on opiate binding in rat brain.
Neuropharmacol. 22, 453-461 (1983)
- Bartolome J.V., Bartolome M.B., Daltner L.A. Evans C.J., Barchas J.D., Kuhn C.M. und Schanberg S.M.: Effects of β -endorphin on ornithine decarboxylase in tissues of developing rats: a potential role for this endogenous neuropeptide in the modulation of tissue growth.
Life Sci. 38, 2355-2362 (1986)
- Bartolome J.V., Bartolome M.B., Harris E.B. und Schanberg S.M.: N-acetyl- β -endorphin stimulates ornithine decarboxylase activity in preweanling rat pups: opioid- and non-opioid-mediated mechanisms.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 240, 895-899 (1987)
- Bauer K.H.: Das Krebsproblem.
Springer, Berlin (1949)

- Bosch D.A.: Short and long term effects of methyl- and ethyl-nitrosourea (MNU & ENU) on the developing nervous system of the rat. I: Long term effects: the induction of (multiple) gliomas.
Acta Neurol. Scand. 55, 85-105 (1977)
- Bowen W., Gentleman S., Herkenham M. und Pert C.: Interconverting mu and delta forms of the opiate receptor in striatal patches.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 4818-4822 (1981)
- Burger P.C., Shibata T. Aguzzi A. und Kleihues P.: Selective induction by N-nitrosoethylurea of oligodendrogliomas in fetal forebrain transplants.
Cancer Res. 48, 2871-2875 (1988)
- Van Calker D., Müller M. und Hamprecht B.: Adrenergic α - and β -receptors expressed by the same cell type in primary culture of perinatal mouse brain.
J. Neurochem. 30, 713-718 (1978)
- Chang M.J.W., Hart R.W. und Koestner A.: Retention of promutagenic O-6-ethylguanine in the DNA of various rat tissues following transplacental inoculation with ethyl-nitrosourea.
Cancer Lett. 9, 199-205 (1980)
- Chavkin C.J., James I.F. und Goldstein A.: Dynorphin is a specific endogenous ligand for the k-opioid receptor.
Science 215, 413-415 (1982)
- Claisse P.J., Roscoe J.P. und Lantos O.L.: Cellular heterogeneity in a ethylnitrosourea-induced glioma: malignancy, karyology and other properties of tumor cell types.
Br. J. Exp. Pathol. 60, 209-224 (1979)
- Corbett A.D., Paterson S.J., McKnight A., Magnan J. und Kosterlitz H.W.: Dynorphin (1-8) and dynorphin (1-9) are ligands for the kappa subtype of opiate receptor.
Nature 299, 78-81 (1982)
- Davis W.M. und Lin C.H.: Prenatal morphine effects on survival and behavior of rat offspring. Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. 3, 205-210 (1972)
- Druckrey H., Ivankovic B. und Preussmann R.: Teratogenic and carcinogenic effects in the offspring after single injection of ethylnitrosourea to pregnant rats.
Nature 210, 1378-1396 (1966)
- Druckrey H., Preussmann R., Ivankovic S. und Schmähl D.: Organotrope carcinogene Wirkungen bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD-Ratten.
Z. Krebsforsch. 69, 103-201 (1967)

- Fujita S., Shimada M. und Nakamura T.: 3-H-Thymidine autoradiographic studies on the cell proliferation and differentiation in the external and internal granular layers of the mouse cerebellum.
J. Comp. Neurol. 128, 191-208 (1966)
- Fujiwara H.: Cytotoxic effects of ethylnitrosourea on central nervous system of rat embryos: special references to carcinogenesis and teratogenesis.
Acta. Pathol. Jpn. 30, 375-387 (1980)
- Gerchman L.L. und Ludlum D.B.: The properties of O-6-methylguanine in templates for RNA-polymerase.
Biochim. Biophys. Acta 308, 310-316 (1973)
- Goerttler K., Arnold H.P. und Michalk D.V.: Über Carcinogen-induzierte diaplacentare Wirkungen bei Ratten.
Z. Krebsforsch. 74, 396-411 (1970)
- Goth R. und Rajewsky M.F.: Persistence of O-6-ethylguanine in rat brain: correlation with nervous system-specific carcinogenesis by ethylnitrosourea.
Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 639-643 (1974)
- Haag M.M. und Soukup S.W.: Association of chromosome 4 abnormalities with ethylnitrosourea-induced neuro-oncogenesis in the rat.
Cancer Res. 44, 784-790 (1984)
- Habs M. und Schmähl D.: Synergistic effects of N-Nitroso-compounds in experimental long-term carcinogenesis studies.
Oncology 37, 259-265 (1980)
- Hallas B.H. und Das G.D.: N-ethyl-N-nitrosourea-induced teratogenesis of brain in the rat. A cellular and cytoarchitectural analysis of the neocortex.
J. Neurol. Sci. 39, 111-122 (1978)
- Handelmann G.E. und Quirion R.: Neonatal exposure to morphine increases μ opiate binding in the adult.
Eur. J. Pharmacol. 94, 357-358 (1983)
- Hansson E.: Primary cultures from defined brain areas; effects of seeding time on the development of β -adrenergic- and dopamine-stimulated cAMP-activity during cultivation.
Dev. Brain Res. 21, 187-192 (1985)
- Harry G.J. und Rosecrans J.A.: Behavioral effects of perinatal naltrexone exposure: a preliminary investigation.
Pharmacol. Biochem. Behav. 11, 19-22 (1979)

- Hauser K.F., McLaughlin P.J. und Zagon I.S.: Endogenous opioids regulate dendritic growth and spine formation in developing rat brain.
Brain Res. 416, 157-161 (1987)
- Herman B.H. und Panksepp J.: Effects of morphine and naloxone on separation distress and approach attachment: evidences for opiate mediation of social affect.
Pharmacol. Biochem. Behav. 9, 213-220 (1978)
- Herrenkohl L.R., Ribary U., Schlumpf M. und Lichtensteiger W.: Maternal stress alters monoamine metabolites in fetal and neonatal rat brain.
Experientia 44, 457-465 (1988)
- Hetta J. und Terenius L.: Prenatal naloxone affects survival and morphine sensitivity of rat offspring.
Neurosci. Lett. 16, 323-327 (1980)
- Hopewell J.W.: The subependymal plate and the genesis of gliomas.
J. Path. 117, 101-103 (1975)
- Ikuta F., Yoshida Y., Ohama E., Oyanagi K., Takeda S., Yamazaki K. und Watabe K.: Revised pathophysiology on BBB damage: The edema as an ingeniously provided condition for all motility and lesion repair.
Acta Neuropath. Suppl. VIII, 103-110 (1983)
- Ikuta F., Yoshida Y., Ohama E., Oyanagi K., Takeda S., Yamazaki K. und Watabe K.: Brain and peripheral nerve edema as an initial stage of the lesion repair: revival of the mechanisms of the normal development of the fetal brain.
Prog. Neurol. Res., Jpn. 28, 599-628 (1984)
- Ivankovic S. und Druckrey H.: Transplazentare Erzeugung maligner Tumoren des Nervensystems. I. Äthyl-nitrosoharnstoff (ÄNH) an BDIX-Ratten.
Z. Krebsforsch. 71, 320-260 (1968)
- Jackson H.C. und Sewell R.D.: The involvement of mu and kappa but not delta opioid receptors in the body weight gain of suckling rats.
Psychopharmacol. 84, 143-144 (1984)
- Jänisch W., Schreiber D., Warzok R. und Osske G.: Frühstadien von Geschwülsten des Zentralnervensystems. Experimentell-morphologische Untersuchung.
Exp. Pathol. (Jena) 4, 60-68 (1970)
- Johannesson T. und Becker B.A.: The effects of maternally administered morphine on the rat fetal development and resultant tolerance to the analgesic effect of morphine.
Acta Pharmacol. Toxicol. 31, 305-313 (1972)

- Johannesson T. und Becker B.A.: Morphine analgesia in rats at various ages.
Acta Pharmacol. Toxicol. 33, 429-441 (1973)
- Kent J., Pert C. und Herkenham M.: Ontogeny of opioid receptors in rat forebrain: visualization by in vitro autoradiography.
Dev. Brain Res. 2, 487-504 (1982)
- Kikuchi Y., Kita T. Miyauchi M., Kizawa I., Oomori K. und Kato K.: Effects of naloxone on human ovarian cancer cell growth in vitro and in vivo.
Jpn. J. Cancer Res. 78, 519-525 (1987)
- Kirby M.L.: Changes in 3-H-Naloxone binding in spinal cord of rats treated prenatally with morphine.
Neuropharmacology 22, 303-307 (1983)
- Kirsch W.M., Grossi-Paoletti E. und Paoletti P.: The experimental biology of brain tumors.
Charles C.Thomas (Hrsg.), Springfield, Illinois (1972)
- Kleihues P.: Blockierung der DNA-Synthese durch N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff in vivo.
Arzneimittelforsch. 19, 1041-1043 (1969)
- Kleihues P., Patzschke K., Margison G.P., Wegner L.A. und Mende C.: Reaction of methylurethanesulphonate with nucleic acids of fetal and newborn rats in vivo.
Z. Krebsforsch. 81, 273-283 (1974)
- Knowles J.F.: Cell death and the cellcycle in the subependymal layer of neonate rats after the administration of ethylnitrosourea.
Appl. Neurobiol. 2, 365-376 (1976)
- Koestner A., Svenberg J.A. und Wechsler W.: Transplacental production with ethylnitrosourea of neoplasms of the nervous system in Sprague-Dawley rats.
Amer. J. Pathol. 63, 37-56 (1971)
- Kokunai T., Korosue K., Tamaki N. und Matsumoto S.: Promoting effect of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on the in vitro malignant transformation of fetal rat brain cells exposed in utero to ethylnitrosourea.
Cancer Res. 46, 1377-1381 (1986)
- Kornblum H.J., Hurlbut D.E. und Leslie F.M.: Postnatal development of multiple opioid receptors in rat brain.
Dev. Brain Res. 31, 21-41 (1987a)
- Kornblum H.J., Loughlin S.E. und Leslie F.M.: Effects of morphine on DNA synthesis in neonatal rat brain.
Dev. Brain Res. 37, 45-52 (1987b)

- Koyama T.: Erzeugung von Mißbildungen im Gehirn durch Methylnitrosoharnstoff und Äthylnitrosoharnstoff an SD-JC-Ratten.
Arch. Jap. Chir. 39, 233-254 (1970)
- Koyama T., Handa J., Handa H. und Matsumoto S.: Experimental hydrocephalus. Postnatal observations of hydrocephalus induced by ethylnitrosourea in SD-JC-rats.
Z. Neurol. 202, 21-36 (1972)
- Von Kreybig T.: Experimentelle Pränatal-Toxikologie.
Arzneim. Forsch. 17, Beiheft, Editio Cantor KG, Aulendorf/Württ. (1968)
- Laerum O.D. und Rajewsky M.F.: Neoplastic transformation of fetal rat brain cells in culture after exposure to ethylnitrosourea in vivo.
J. Natl. Cancer Inst. 55, 1177-1187 (1975)
- Lantos P.L.: The role of the subependymal plate in the origin of gliomas induced by ethylnitrosourea in the rat brain.
Experientia 33, 521-522 (1977)
- Lantos P.L. und Cox D.J.: The origin of experimental brain tumors: a sequential study.
Experientia 32, 1467-1468 (1976)
- Lantos P.L. und Pilkington G.J.: The development of experimental brain tumors. A sequential light and electron microscope study of the subependymal plate. I. Early lesions (abnormal cell clusters).
Acta Neuropathol. 45, 167-175 (1979)
- Lijinsky W., Reuber M.D. und Riggs C.W.: Carcinogenesis by combinations of N-nitroso compounds in rats.
Food Chem. Toxicol. 21, 601-605 (1983)
- Loughlin S.E., Massamiri T.R., Kornblum H.J. und Leslie F.M.: Postnatal development of opioid systems in rat brain.
Neuropeptides 5, 469-472 (1985)
- Loveless A.: Possible relevance to the mutagenicity and carcinogenicity of nitrosamines and nitrosamides.
Nature 223, 206-211 (1969)
- Magee P.N. und Barnes J.M.: The production of malignant primary hepatic tumors in the rat by feeding dimethylnitrosamine.
Brit. J. Cancer 10, 114-122 (1956)
- Magee P.N., Nicoll J.W., Pegg A.E. und Swann P.F.: Alkylating intermediates in nitrosamine metabolism.
Biochem. Soc. Trans. 3, 62-68 (1975)

- McLaughlin P.J. und Zagon I.S.: Modulation of human neuroblastoma transplanted into nude mice by endogenous opioid systems.
Life Sci. 41, 1465-1472 (1987)
- Mennel H.D. und Simon H.: Morphology of early stages of ENU-induced brain tumors in rats.
Exp. Path. 28, 207-214 (1985)
- Miaskowski U.: Das Wachstumsverhalten der germinativen Zone des Großhirns nach pränataler Röntgenbestrahlung und postnataler Opioidrezeptorblockade bei der Ratte.
Vet. Med. Diss. (1988)
- Mitelman F. und Levan G.: Highly malignant cells with normal karyotype in G-banding.
Hereditas 80, 291-293 (1975)
- Moldow R.L., Kastin A.J., Hollander C.S., Coy D.H. und Sandman C.A.: Brain β -endorphin-like immunoreactivity in adult rats given β -endorphin neonatally.
Brain Res. 7, 683-686 (1981)
- Morris G. und Slotkin T.A.: Beta-2-adrenergic control of ornithine decarboxylase activity in brain regions of the developing rat.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 233, 141-147 (1985)
- Morrison J.H., Grzanna R., Molliver M.E. und Coyle J.T.: The distribution and orientation of noradrenergic fibers in neocortex of the rat: an immunofluorescence study.
J. Comp. Neur. 181, 17-40 (1978)
- Morrison J.H., Molliver M.E. und Grzanna R.: Noradrenergic innervation of cerebral cortex: widespread effects of local cortical lesions.
Science 205, 313-316 (1979)
- Müller R. und Rajewsky M.F.: Elimination of O-6-ethylguanine from the DNA of brain, liver, and other rat tissues exposed to ethylnitrosourea at different stages of pre-natal development.
Cancer Res. 43, 2897-2904 (1983)
- Murgo A.J.: Inhibition of B16-BL6-melanoma growth in mice by methionine-enkephaline.
J. Natl. Cancer Inst., 75/2 341-344 (1985)
- Murgo A.J.: Effects of [Met]enkephalin and corticosterone on thymus weight and tumor growth.
Neuroendocrinol. Lett. 8, 79-85 (1986)

- Naito M., Naito Y., Ito A., Watanabe H. und Kawashima K.: Spinal cord tumors induced by N-ethyl-N-nitrosourea in rats: presence of spinal subpial target cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 72, 715-724 (1984)
- Naito M., Aoyama H., Naito Y., Fujioka Y. und Ito A.: Morphological and immunohistochemical evidence for the presence of subcortical target cells of N-ethyl-N-nitrosourea-induced cerebellar tumors in rats. *Cancer Res.* 46, 5836-5841 (1986)
- O'Callaghan J.P. und Holtzman S.G.: Prenatal administration of morphine to the rat: tolerance to the analgetic effect of morphine in the offspring. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 197, 533-539 (1976)
- O'Callaghan J.P. und Holtzman S.G.: Prenatal administration of levorphanol or dextrorphan to the rat: analgesic effect of morphine in the offspring. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 200, 255-260 (1977)
- Oyanagi K., Yoshida Y und Ikuta F.: The chronology of lesion repair in the developing rat brain: biological significance of the pre-existing extracellular space. *Virchows Arch. A. [Pathol. Anat.]* 408, 347-359 (1986)
- Paul L., Diaz J. und Bailey B.: Behavioral effects of chronic narcotic antagonist administration to infant rats. *Neuropharmacology* 17, 655-657 (1978)
- Paxinos G. und Watson C. (Hrsg.): *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Second Edition, Academic Press, New York (1986)
- Petrillo P., Tavani A., Verotta D., Robson L.E. und Kosterlitz H.W.: Differential postnatal development of μ -, δ - and κ -opioid binding sites in rat brain. *Dev. Brain Res.* 428, 53-58 (1982)
- Pfaffenroth M.J. und McAllister J.P.: Teratologic effects of ethylnitrosourea on brain development in rats. *Teratology* 9, 305-316 (1974)
- Pilkington G.J. und Lantos P.L.: The development of experimental brain tumors. A sequential light and electron microscope study of subependymal plate. II. Microtumors. *Acta Neuropathol.* 45, 177-185 (1979)
- Pittman R.N., Minneman K.P. und Molinoff P.B.: Ontogeny of β -adrenergic receptors in rat cerebellum and cerebral cortex. *Brain Res.* 188, 357-368 (1980)
- Preussmann R.: Carcinogenic N-nitroso compounds and their environmental significance. *Naturwissenschaften* 71, 25-30 (1984)

- Reggiani A., Carenzi A. und Della Bella D.: Influence of opioids on β -receptor down-regulation: studies in cultured C-6-glioma cells.
Brain Res. 423, 254-260 (1987)
- Rougon G., Noble M. und Mudge A.W.: Neuropeptides modulate the β -adrenergic response of purified astrocytes in vitro.
Nature 305, 715-717 (1983)
- Sandman C.A., McGivern R.F., Berka C., Walker J.M., Coy D.H. und Kastin A.J.: Neonatal administration of β -endorphin produces "chronic" insensitivity to thermal stimuli.
Life Sci. 25, 1755-1760 (1979)
- Schiffer D., Giordana M.T., Pezzotta S., Lechner C. und Paoletti P.: Cerebral tumors induced by transplanted ENU: Study of the different tumoral stages, particularly of early proliferations.
Acta Neuropathol. 41, 27-31 (1978)
- Schiffer D., Giordana M.T., Racagni G., Bruno F., Pezzotta S. und Paoletti P.: Experimental brain tumors by transplanted ENU. Multifactorial study of the latency period.
Acta Neuropathol. 49, 117-122 (1980)
- Schmahl W., Plendl J. und Reinöhl-Kompa S.: Effects of naltrexone in postnatal rats on the recovery of disturbed brain and lymphatic tissues after X-irradiation or ethylnitrosourea treatment in utero.
Res. Com. Chem. Pathol. Pharmacol. 55, 89-99 (1987)
- Shain W., Madelian V., Martin D.L., Kimelberg H.K., Perro-ne M. und Lepore R.: Activation of β -adrenergic receptors stimulates release of an inhibitory transmitter from astrocytes.
J. Neurochem. 46, 1298-1303 (1986)
- Sharma T.R., Chan W.C. und Gintzler A.R.: Effect of chronic naltrexone administration and its withdrawal on the regional activity of neurons that contain norepinephrine, dopamine and serotonin.
Brain Res. 442, 379-386 (1988)
- Sibley D.R. und Lefkowitz R.J.: Biochemical mechanisms of the β -adrenergic receptor regulation.
isi Alat of Science: Pharmacology, 66-70 (1988)
- Singer B.: All oxygens in nucleic acids react with carcinogenic ethylating agents.
nature 264, 333-339 (1976)

- Singer B., Bodell W.J., Cleaver J.E., Thomas G.H., Rajewsky M.F. und Thon W.: Oxygens in DNA are main targets for ethylnitrosourea in normal and xeroderma pigmentosum fibroblasts and fetal rat brain cells.
Nature 276, 85-88 (1978)
- Slotkin T.A., Whitmore W.L. Orband-Miller L., Queen K.L. und Haim K.: Beta adrenergic control of macromolecule synthesis in neonatal rat heart, kidney and lung: relationship to sympathetic neuronal development.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 243, 101-109 (1987)
- Slotkin T.A., Levant B., Orband-Miller L., Queen K.L. und Stasheff S.: Do sympathetic neurons coordinate cellular development in the heart and kidney? Effects of neonatal central and peripheral catecholaminergic lesions on cardiac and renal nucleic acids and proteins.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 244, 166-172 (1988)
- Sonderegger T.B., Bromley B. und Zimmermann E.: Effects of morphine pellet implantation in neonatal rats.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 154, 435-438 (1977)
- Svenberg J.A., Koestner A., Wechsler W. und Denlinger R.H.: Quantitative aspects of transplacental tumor induction with ethylnitrosourea in rats.
Cancer Res. 32, 2656-2660 (1972)
- Tempel A., Zukin S. und Gardner. E.L.: Supersensitivity of brain opiate receptor subtypes after chronic naltrexone treatment.
Life Sci. 31, 1401-1404 (1982)
- Tempel A., Gardner E.L. und Zukin R.S.: Neurochemical and functional correlates of naltrexone-induced opiate receptor up-regulation.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 232, 439-445 (1984)
- Tempel A., Habas J. Paredes W. und Barr G.A.: Morphine-induced downregulation of μ -opioid receptors in neonatal rat brain.
Dev. Brain Res. 41, 129-133 (1988)
- Tsang D. und Ng S.C.: Effect of antenatal exposure to opiates on the development of opiate receptors in rat brain.
Brain Res. 188, 199-206 (1980)
- Unnerstall J.R., Molliver M.E., Kuhar M.J. und Palacios J.M.: Ontogeny of opiate binding sites in the hippocampus, olfactory bulb, and other regions of the rat forebrain by autoradiographic methods.
Dev. Brain Res. 7, 157-169 (1983)

- Vértes Z., Melegh G., Vértes M. und Kovacs S.: Effect of naloxone and D-Met-2-Pro-5-enkephalinamide treatment on the DNA synthesis in the developing rat brain. *Life Sci.* 31, 119-126 (1982)
- Vorhees C.V.: Effects of prenatal naloxone exposure on post-natal behavioral development of rats. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 3, 295-301 (1981)
- Wechsler W.: Teratogenic and oncogenic effects of ethylnitrosourea on the developing nervous system of rats. In: CIBA Symposium, London (ed: Cavanagh, London) (1972)
- Yoburn B.C., Goodman R.R., Cohen A.H., Pasternak G.W. und Inturrisi C.E.: Increased analgesic potency of morphine and increased brain opioid binding sites in the rat following chronic naltrexone treatment. *Life Sci.* 36, 2325-2332 (1985)
- Yoshida Y., Oyanagi K. und Ikuta F.: Initial cellular damage in the developing rat brain caused by cytotoxicity of ethylnitrosourea. *Brain Nerve* 36, 175-182 (1984)
- Zadina J.E., Kastin A.J., Coy D.H. und Adinoff B.A.: Developmental behavioral, and opiate receptor changes after prenatal or postnatal β -endorphin, GRF, or Tyr-MIF-1. *Psychoneuroendocrinol.* 10, 367-383 (1985)
- Zagon I.S., McLaughlin P.J., Takemori A.E. und Portoghesi P.S.: β -Funaltrexamine (β -FNA) and neural tumor response in mice. *Europ. J. Pharmacol.* 116, 165-169 (1985)
- Zagon I.S. und McLaughlin P.J.: Naloxone prolongs the survival time of mice treated with neuroblastoma. *Life Sci.* 28, 1095-1102 (1981a)
- Zagon I.S. und McLaughlin P.J.: Heroin prolongs survival time and retards tumor growth in mice with neuroblastoma. *Brain Res. Bull.* 7, 25-32 (1981b)
- Zagon I.S. und McLaughlin P.J.: Neuronal cell deficits following maternal exposure to methadone in rats. *Experientia* 38, 1214-1216 (1982)
- Zagon I.S. und McLaughlin P.J.: Opioid antagonists inhibit the growth of metastatic murine neuroblastoma. *Cancer Lett.* 21, 89-94 (1983a)
- Zagon I.S. und McLaughlin P.J.: Naltrexone modulates tumor response in mice with neuroblastoma. *Science* 221, 671-672 (1983b)

- Zagon I.S. und McLaughlin P.J.: Duration of opiate receptor blockade determines tumorigenic response in mice with neuroblastoma: a role for opioid systems in cancer. *Life Sci.* 35, 409-416 (1984a)
- Zagon I.S. und McLaughlin P.J.: Naltrexone modulates body and brain development in rats: a role for endogenous opioid systems in growth. *Life Sci.* 35, 2057-2064 (1984b)
- Zagon I.S. und McLaughlin P.J.: Stereospecific modulation of tumorigenicity by opioid antagonists. *Europ. J. Pharmacol.* 113, 115-120 (1985)
- Zagon I.S. und McLaughlin P.J.: Opioid antagonist-induced modulation of cerebral and hippocampal development: histological and morphometric studies. *Dev. Brain Res.* 28, 233-246 (1986)
- Zagon I.S. und McLaughlin P.J.: Modulation of murine neuroblastoma in nude mice by opioid antagonists. *J. Natl. Cancer Inst.* 78, 141-147 (1987)

DANKSAGUNG

Herrn Dr.Dr.habil. Wolfgang Schmahl danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, für die stets gewährte einsatzfreudige Unterstützung sowie für seine vielen hilfreichen Hinweise und Anregungen bei der Durchführung meiner Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau E. Senft, Frau I. diGrazia und Frau I. Steege für die Einweisung in historische Arbeitstechniken und ihre Hilfe bei auftretenden Problemen bedanken.

Für die freundschaftliche Zusammenarbeit möchte ich mich besonders herzlich bei Frau Ursula Miaskowski bedanken.

LEBENS LAUF

Ruth Funk, geb. Daum
Dietrichstr. 2
8000 München 19

geboren am	13. Januar 1961
in	Kleve
Eltern	Dr.jur. Willi Daum und Gerda Daum, geb. Spies
Familienstand	verheiratet
Konfession	römisch-katholisch
Schulausbildung	1967-1971 Grundschule Stier- stadt
	1971-1980 Gymnasium Oberursel
	30.6.1980 Abitur
Studium	1980-1981 Romanische Philologie an der Johann-Wolfgang-von- Goethe-Universität, Frankfurt
	ab 1981 Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
	21.9.1987 Approbation als Tierärztin
ab Okt.1987	Dissertation am Institut für Pathologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, Neuherberg bei München

